



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO DE AGENTES DE DOENÇAS CANINAS DE TRANSMISSÃO VECTORIAL  
NUMA POPULAÇÃO DE CÃES COM FUNÇÕES MILITARES E POLICIAIS

RUI ANDRÉ CARVALHO VIDAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Ilda Maria Neto Gomes Rosa

Dra. Joana Filipa Paiva de Ferreira  
Gomes Carneiro

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

CO-ORIENTADOR

Dra. Joana Filipa Paiva de Ferreira  
Gomes Carneiro

2013  
LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO DE AGENTES DE DOENÇAS CANINAS DE TRANSMISSÃO VECTORIAL  
NUMA POPULAÇÃO DE CÃES COM FUNÇÕES MILITARES E POLICIAIS

RUI ANDRÉ CARVALHO VIDAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Ilda Maria Neto Gomes Rosa

Dra. Joana Filipa Paiva de Ferreira  
Gomes Carneiro

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

CO-ORIENTADOR

Dra. Joana Filipa Paiva de Ferreira  
Gomes Carneiro

2013  
LISBOA

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Luís Madeira de Carvalho, base elementar deste trabalho e um exímio guia tanto na ciência veterinária como na arte do pensamento positivo.

À Dra. Joana Gomes, pela excelente cooperação enquanto orientadora durante o período de estágio no Hospital Escolar.

Ao Dr. Hugo Rocha, Capitão Médico Veterinário da Guarda Nacional Republicana que estabeleceu a ponte entre este trabalho e a instituição que representa.

À Dra. Lídia Gomes, pelo contributo fundamental e infalível prontidão perante as in experiências do autor.

À Prof. Dra. Isabel Fonseca pela colaboração durante a permanência no Laboratório de Parasitologia da FMV-UTL.

Aos Drs. Ana Margarida Alho, Cátia Marques e David Ramilo, que disponibilizaram uma ajuda bem-disposta indispensável.

À família e amigos.

## Resumo

### Rastreo de doenças caninas de transmissão vectorial numa população de cães com funções militares e policiais

O presente estudo reporta um rastreio de doenças caninas de transmissão vectorial (do inglês *Canine Vector Borne Diseases* – CVBD) em cães polícias/militares da Guarda Nacional Republicana (GNR). Nos últimos anos as CVBD representam uma problemática crescente na Europa, em virtude da alteração/expansão dos padrões de distribuição em regiões endémicas e não endémicas. Em Portugal os cães estão expostos à infecção por vários agentes transmitidos por vectores, como protozoários, bactérias e helmintes. Carraças, flebótomos e mosquitos são alguns dos vectores, destes agentes, no cão. Por estarem frequentemente expostos a *habitats* propícios ao desenvolvimento de vectores, os cães com funções militares ou policiais estão entre os grupos de risco, embora actualmente não se disponham de dados relativos ao impacto destes agentes em cães de trabalho assintomáticos.

De modo a contribuir para este conhecimento, colheram-se amostras de sangue total de 129 cães assintomáticos do efectivo da GNR e procedeu-se a um rastreio de agentes transmitidos por vectores. As amostras foram pesquisadas pelo teste de *Knott* e esfregaço sanguíneo para a presença de microfilárias e hemoparasitas, como *Babesia*, *Mycoplasma*, *Ehrlichia*, *Hepatozoon* e *Anaplasma*; foi ainda realizada Imunofluorescência Indirecta (IFI) para detecção de anticorpos de *Leishmania infantum*. Um total de oito cães (6,2%) demonstrou infecção por um único agente: três positivos para *Mycoplasma* spp. (2,3%), dois evidenciaram presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum* (1,6%), assim como dois casos de *Babesia* spp. (1,6%), e um de microfilárias de *Dirofilaria immitis* (0,8%).

Apesar de todas as medidas direccionadas para a prevenção de CVBD, estes resultados devem suscitar um alerta sobre a exposição à infecção desta população de cães polícias/militares. Adicionalmente, este rastreio foi efectuado em animais assintomáticos, um contexto que não favorece a sensibilidade de alguns dos métodos de detecção usados, e como tal, estes resultados podem subestimar o número real de infecções na população. Finalmente, alguns dos agentes de CVBD apresentam risco zoonótico, pelo que animais infectados de forma sub-clínica tornam-se reservatórios inaparentes de infecção.

Palavras-chave: Cães polícias/militares, CVBD, *Babesia*, *Mycoplasma*, *Leishmania*, *Dirofilaria*, IFI, Knott, esfregaço sanguíneo.

## Abstract

### Survey of canine vector borne diseases in police/military working dogs

The following study reports a survey for Canine Vector Borne Diseases (CVBD) on military and police working dogs from Guarda Nacional Republicana (GNR – Portuguese Republican National Guard) a security force with military status. In recent years, CVBD have been a major issue in Europe due to changing/expanding distribution patterns along endemic and previously non-endemic areas. In Portugal, dogs are at risk of becoming infected by different vector-borne pathogens, including protozoa, bacteria, and helminths. Ticks, phlebotomine sand flies, and mosquitoes are recognized as vectors of some of these pathogens in dogs. Military and police working dogs are among the high risk groups by being frequently exposed to *habitats* suitable for vector development, though data concerning the impact of these agents among asymptomatic working dogs is not available.

To address this issue, whole blood samples were collected from 129 asymptomatic GNR police/military dogs and screened for vector-borne pathogens. The Knott test and Giemsa stained blood smears were performed on all samples, to detect the presence of microfilariae and hemoparasites such as *Babesia*, *Mycoplasma*, *Ehrlichia*, *Hepatozoon* and *Anaplasma*; as well as an Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT) to detect *Leishmania infantum* antibodies. A total of 8 dogs (6,2%) showed single infections by one of these agents: three dogs (2,3%) were positive for *Mycoplasma* spp. (presumably *Mycoplasma haemocanis*); *Leishmania infantum* antibodies were present in two dogs (1,6 %); *Babesia* spp. was also identified in 2 dogs (1,6%); and *Dirofilaria immitis* microfilariae were present in one dog (0,8%).

Despite all measures already applied to prevent CVBD, these findings raise some concern over the exposure to infection in these police/military working dogs. Furthermore, the screening was conducted on asymptomatic animals, which do not provide the optimal targets for some of the methods applied here, and therefore it is possible that these results underestimate the real number of infections in the sample. Finally, sub clinically infected dogs can be unrecognized reservoirs for some CVBD-causing pathogens that pose a zoonotic concern.

Keywords: CVBD, police/military working dogs, *Babesia*, *Mycoplasma*, *Leishmania*, *Dirofilaria*, IFAT, Knott, blood smear

## Índice Geral

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Lista de figuras .....	ix
Lista de gráficos.....	x
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Capítulo 1 – Estágio curricular e o tema em foco. ....	1
Capítulo 2 – Introdução: parasitas e vectores .....	2
Capítulo 3 – Revisão bibliográfica .....	6
1. Piroplasmose: <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i> .....	6
1.1. Ciclo de vida.....	6
1.2. Etiologia e Epidemiologia .....	7
1.3. Patologia e quadro clínico .....	10
1.4. Diagnóstico.....	12
1.5. Tratamento, profilaxia e saúde pública .....	14
2. Hemoplasmose: <i>Mycoplasma haemocanis</i> e “ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> ” .....	16
2.1. Etiologia e epidemiologia.....	16
2.2. Patologia e quadro clínico .....	18
2.3. Diagnóstico.....	18
2.4. Tratamento, profilaxia e saúde pública .....	19
3. Hepatozoonose: <i>Hepatozoon canis</i> .....	20
3.1. Ciclo de vida, etiologia e epidemiologia .....	20
3.2. Patologia e quadro clínico .....	20
3.3. Diagnóstico.....	21
3.4. Tratamento, profilaxia e saúde pública .....	21
4. Erliquioses e Anaplasmoses .....	22
4.1. Erliquiose Monocítica Canina: <i>Ehrlichia canis</i> .....	23
4.1.1. Ciclo de vida, etiologia e epidemiologia.....	23
4.1.2. Patologia e quadro clínico .....	23
4.1.3. Diagnóstico .....	23
4.1.4. Tratamento, profilaxia e saúde pública.....	24
4.2. Anaplasmosose: <i>Anaplasma platys</i> e <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	24
4.2.1. Ciclo de vida, etiologia e epidemiologia:.....	24
4.2.2. Patologia e quadro clínico .....	25
4.2.3. Diagnóstico .....	26
4.2.4. Tratamento, profilaxia e saúde pública .....	26
5. Leishmaniose: <i>Leishmania infantum</i> .....	27
5.1. Ciclo de vida.....	27

5.2. Etiologia e epidemiologia.....	27
5.3. Patologia e quadro clínico .....	29
5.4. Diagnóstico .....	30
5.5. Tratamento, profilaxia e saúde pública .....	32
6. <i>Dirofilariose: Dirofilaria immitis</i> .....	34
6.1. Ciclo de vida.....	34
6.2. Etiologia e Epidemiologia .....	34
6.3. Patologia e quadro clínico .....	36
6.4. Diagnóstico .....	37
6.5. Tratamento, profilaxia e saúde pública .....	39
Capítulo 4 – Rastreamento de doenças caninas de transmissão vectorial numa população de cães polícias/militares .....	41
1. Objectivos.....	41
2. Material e métodos .....	41
2.1. Caracterização da população amostrada .....	41
2.2. Colheita e processamento das amostras.....	41
2.3. Metodologia.....	41
2.3.1. Serologia: imunofluorescência indirecta .....	42
2.3.2. Esfregaços sanguíneos.....	43
2.3.3. Técnica de Knott (1939) Modificada.....	44
2.4. Análise dos dados .....	45
3. Resultados.....	46
3.1. Características da população amostrada.....	46
3.2. Prevalência de infecções na população amostrada .....	50
3.3. Esfregaços sanguíneos: <i>Babesia</i> spp.e <i>Mycoplasma</i> spp. ....	52
3.4. Teste de Knott: <i>Dirofilaria immitis</i> .....	54
3.5. IFI: <i>Leishmania infantum</i> .....	54
4. Discussão .....	55
5. Conclusão.....	68
Bibliografia.....	69

## Lista de figuras

- Figura 1 – Distribuição geográfica da dirofilariose canina 2001-2011: a vermelho zonas endémicas, a rosa zonas com casos esporádicos, a branco zonas sem informação (Morchón et al., 2012).....4
- Figura 2 – GIC em cenário de montanha; B: detecção de vestígios hemáticos (GNR, 2012). C: Binómio em patrulha na margem do Rio Evros (fronteira greco-turqua), no âmbito do combate à imigração ilegal, sob coordenação da Agência Europeia de Gestão da Cooperação Operacional nas Fronteiras Externas (FRONTEX, 2011).....5
- Figura 3 – Esfregaço sanguíneo de canídeo (1000x): A - *B. microti-like* (Simões et al., 2011) B – *B. gibsoni* (Irwin, 2010).....13
- Figura 4 – Inclusões de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em esfregaço sanguíneo corado por Giemsa (1000x): A: mórulas de *A. platys* em plaquetas; B: mórula de *E. canis* em neutrófilo; C:



mórulas de <i>A. phagocytophilum</i> em neutrófilo (Harvey, 2012b).....	24
Figura 5 – Extremidade anterior e posterior de <i>D. immitis</i> (A, B) e <i>D. repens</i> (C, D) visualizadas através do Teste de Knott modificado (Traversa, Di Cesare & Conboy, 2010).....	45
Figura 6 – Mapa de Portugal, a verde os distritos e regiões autónomas com representação na amostra.....	46
Figura 7 – Distribuição geográfica dos agentes detectados na amostra: as secções cinotécnicas de Lisboa apresentam o maior número de infecções, com 2 casos de <i>L. infantum</i> e 1 de <i>Mycoplasma</i> spp.; em seguida, Faro com 2 cães infectados ( <i>D. immitis</i> e <i>Mycoplasma</i> spp.); nos restantes distritos evidenciados ocorreu apenas uma infecção, nas secções cinotécnicas de Viseu e Braga por <i>Babesia</i> spp., e em Vila Real por <i>Mycoplasma</i> spp.....	50
Figura 8 – Forma intra-eritrocitária de <i>Babesia</i> sp. no canídeo de Braga (1000x).....	52
Figura 9 – Várias formas de <i>Babesia</i> spp. num canídeo de Viseu (600x).....	52
Figura 10 – Dois campos ópticos de esfregaços sanguíneos de cães infectados por <i>Mycoplasma</i> spp. (ampliação aproximada 500x).....	53
Figura 11 – A: degeneração citoplasmática de leucócitos (ampliação aproximada 300X); B: agregação plaquetária (ampliação aproximada 200X); C: equinócitos (Ampliação aproximada 400X).....	53
Figura 12 – Microfilária de <i>D. immitis</i> isolada em fundo de eritrócitos lisados,, teste de knott;	
Figura 13 – Microfilária em esfregaço sanguíneo (200x).....	54
Figura 14 – Microscópio de fluorescência; A: aspecto do teste positivo, com promastigotas evidenciando intensa coloração verde fluorescente correspondente a uma amostra positiva a <i>L. infantum</i> ; B: teste negativo, promastigotas sem fluorescência.....	54

## Lista de gráficos

Gráfico 1 – Representação gráfica da distribuição dos cães pelas diversas secções cinotécnicas, onde é possível verificar que o distrito de Lisboa abrange quase um quarto (24%) da população.....	47
Gráfico 2 – Proporção dos grupos etários na população (frequência relativa válida).....	48
Gráfico 3 – Proporção dos sexos na população (frequência relativa válida) .....	48
Gráfico 4 – Proporção das raças na população (frequência relativa válida) .....	49
Gráfico 5 – Cães positivos a agentes de CVBD na população a vermelho, face aos negativos a azul .....	51
Gráfico 6 – Frequência relativa dos agentes no total das infecções.....	51
Gráfico 7 – Distribuição das infecções por faixa etária.....	52
Gráfico 8 – Distribuição das infecções por sexo .....	52
Gráfico 9 – Distribuição das infecções pelas raças.....	52

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Conhecimento actual das espécies de piroplasmas que infectam o cão, a sua morfologia no eritrócito, o(s) vectore(s) de transmissão e a distribuição geográfica. (Birkenheuer, 2012).....	8
Tabela 2 – Eriquioses e anaplasmoses caninas, espécies (as espécies em estudo a negrito), tropismo celular, vectores competentes e distribuição geográfica (Harrus, Waner & Neer, 2012).....	22
Tabela 3 – Achados de anamnese e exame físico mais comuns na leishmaniose canina (Baneth & Solano-Gallego, 2012).....	30
Tabela 4 - Características morfológicas de microfilárias em sangue de cão (Bowman, 2009).....	44
Tabela 5 – Distribuição geográfica dos cães.....	46

Tabela 6 – Grupos etários; frequência absoluta na amostra, frequência relativa, frequência relativa válida (97 animais com informação válida); sem informação em 32 cães.....	47
Tabela 7 – Frequência de machos e fêmeas na população; 97 cães com informação válida (frequência relativa válida), 32 informação ausente.....	48
Tabela 8 – Frequência de raças na população: 97 dados válidos; 32 sem informação.....	49
Tabela 9 – Resultados da pesquisa por CVBD na população.....	50
Tabela 10 – Dados relativos aos cães infectados.....	51

## Lista de abreviaturas

μL – Microlitro
AGC – Anaplasmosse granulocítica canina
ALT – Alanina amino transferase
CVBD – <i>Canine Vector Borne Diseases</i>
DAT – <i>Direct Agglutination Test</i>
DM – Dihidroclorato de melarsomina
EDTA – <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA – <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMC – Erliquiose monocítica canina
ESCCAP – <i>European Scientific Counsel Companion Animal Parasites</i>
EUA – Estados Unidos da América
FAS – Fosfatase alcalina sérica
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
GIC – Grupo de Intervenção Cinotécnico
GNR – Guarda Nacional republicana
IFI – Imunofluorescência indirecta
IM – Via intramuscular
ml – Mililitro
n – Número de animais
PBS – <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR – <i>Polymerase chain reaction</i>
rpm – Rotações por minuto
SC – Via subcutânea
sp. – Espécie
spp. – Espécies
UTL – Universidade Técnica de Lisboa



## **Capítulo 1 – Estágio curricular e o tema em foco.**

O estágio curricular foi realizado em duas partes, a primeira no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL), durante o período compreendido entre 1 Junho e 15 de Outubro de 2011; a segunda parte realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL, num total de 962 horas.

Grande parte da permanência no Hospital Escolar consistiu na observação e participação nos serviços de Medicina Interna, Cirurgia, Imagiologia e Internamento. Além das consultas de rotina, houve oportunidade de assistir a consultas de referência em dermatologia, oftalmologia, cardiologia, ortopedia e reprodução. Ainda durante este período, uma das actividades mais gratificantes foi a participação nas rotinas do Banco de Sangue do Hospital Escolar. Desde a colheita de sangue em animais das Forças Armadas, passando pelas recolhas em ambientes exteriores como a Fundação São Francisco de Assis, até ao culminar destas actividades no resultado terapêutico em animais sujeitos à transfusão sanguínea. É neste contexto que desperta o interesse pelo rastreio de agentes patogénicos em amostras sanguíneas, reforçado pela constatação de um elevado número de casos de hemoparasitas transmitidos por vectores durante a permanência no Hospital, também alvo de particular alerta no Banco de Sangue. Inegavelmente, a atenção direccionada para estas doenças, reflecte a sua actual e transversal relevância na prática clínica veterinária.

Durante a permanência no Laboratório de Doenças Parasitárias surgiu a hipótese de efectuar um rastreio de parasitas sanguíneos em amostras de cães da Guarda Nacional Republicana (GNR). Perante a oportunidade e mediante os recursos disponíveis, foi possível concluir um rastreio de agentes transmitidos por vectores nestes animais e que se pretende agora reportar neste trabalho.

## Capítulo 2 – Introdução

### 2.1 – Parasitas e vectores

O parasitismo é uma forma de simbiose na qual um dos organismos obtém vantagem em detrimento do outro (Lawrence, 2005). A evolução desta relação depende de vários factores como: a condição geral do hospedeiro, a carga parasitária, e o tipo e grau da lesão que o parasita provoca. O prejuízo para o hospedeiro poderá ser imperceptível, substancial, ou mesmo insustentável e eventualmente fatal.

Na busca por uma definição objectiva de uma relação de parasitismo, poder-se-á socorrer das palavras publicadas há mais de um século por James Law (1903) (citado por Bowman, 2009): *“one of the two draws its subsistence from the other to its appreciable injury.”* Ou seja, estamos perante um parasita quando é possível verificar prejuízo para o hospedeiro vivo. Vários autores concordam que os conceitos de parasita e hospedeiro compreendem todos os organismos que se enquadram nesta relação, sejam multicelulares, unicelulares ou até vírus (Gosling, 2005; Mehlhorn, 2008; Bowman, 2009). Outros autores salientam que esta definição sobrepõe a de agente patogénico, reservando o termo parasita para organismos classificados como animais (isto é, protozoários, helmintes e artrópodes), enquanto fungos, bactérias, rickettsias e vírus, são considerados agentes patogénicos (Eldridge & Edman, 2003). Contudo, é factual que os parasitas estão em maioria entre os seres vivos, mesmo excluindo vírus, rickettsias e todas as bactérias patogénicas (Roberts & Janovy, 2009).

Esta biodiversidade impõe a necessidade de categorização, e no domínio da sistemática a parasitologia enfrenta dificuldades acrescidas, sobretudo quando se atende à perspectiva evolutiva. À excepção de vestígios ocasionais, as evidências fósseis de parasitas são praticamente inexistentes; assim, categorias hierarquicamente superiores a espécie foram sendo atribuídas com base em deduções subjectivas acerca da similaridade morfológica entre vários grupos de organismos (Bowman, 2009). Não obstante o proveito desta lógica na categorização das espécies, à medida que o conhecimento progride, novas técnicas como a sequenciação genética demonstram algumas das suas falhas e apresentam resultados mais objectivos. Não é surpreendente que a taxonomia permaneça hoje uma área tão vibrante como há um século atrás (Roberts & Janovy, 2009).

A biodiversidade parasitária é também evidente nas complexas relações biológicas com os hospedeiros, singulares no mundo animal e expressas em diferentes padrões de interacção (Cox, 1993). Alguns parasitas não dependem do hospedeiro e a infecção ocorrerá apenas mediante oportunidade; por oposição aos parasitas obrigatórios, cujo ciclo de vida inclui forçosamente estádios no hospedeiro. Verifica-se também um grau variável de exclusividade entre os hospedeiros: se a infecção ocorre apenas numa espécie, há um hospedeiro específico para o parasita; enquanto alguns podem infectar um número restrito de espécies relacionadas, poucos são capazes de infectar várias espécies distintas. Nos casos em que o ciclo de vida inclui vários hospedeiros, define-se como hospedeiro definitivo aquele onde o

parasita atinge a fase adulta ou é capaz de reprodução sexuada; o outro hospedeiro é o intermediário, onde se desenvolvem os restantes estádios intermediários ou larvares do parasita (Bowman, 2009). Enquadrado nas relações entre um parasita e vários hospedeiros surge o vector. Este é um hospedeiro definitivo ou intermediário, capaz de transmitir o parasita a outro hospedeiro. A transmissão vectorial ocorre em várias doenças infecciosas em que o agente é transmitido ao hospedeiro mamífero através de artrópodes ou outros intermediários biológicos (Roberts & Janovy, 2009).

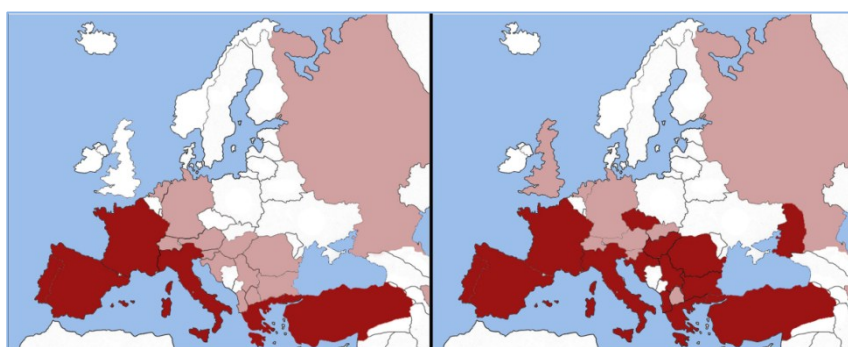
A nível global tem-se verificado um aumento da importância das doenças de transmissão vectorial, tanto em humanos como nas espécies veterinárias. Nos cães, as doenças caninas de transmissão vectorial (*Canine Vector Borne Diseases* – CVBD) são frequentemente o motivo para o recurso aos serviços veterinários. Carrças, mosquitos e pulgas constam como os principais vectores de doenças infecciosas no cão, ao transmitirem vírus, rickettsias, bactérias, protozoários e até mesmo helmintes. Várias CVBD são hoje uma realidade em regiões endémicas como Portugal e uma preocupação emergente em vários países europeus (ESCAPP, 2012). A crescente disponibilidade de mais e melhores meios de diagnóstico é objectivamente significativa nesta tendência de expansão, porém, a maioria dos autores aponta sobretudo modificações ambientais, fruto da contribuição sinérgica de diversos factores. As modificações ambientais envolvem não só o impacto das alterações climáticas, mas também o crescimento exponencial da mobilidade de seres vivos e matérias-primas, associado à compulsiva ocupação de *habitats* silvestres pelo Homem e animais domésticos (Madeira de Carvalho, 2008; Conraths & Mettenleiter, 2011).

Focando a atenção na Europa, as populações de vectores estão há muito estabelecidas nos países de clima mais quente que compõem a região mediterrânica, onde as CVBD são uma realidade comum. Contudo, tem sido reportado um número crescente de casos de CVBD autóctones em regiões a latitudes elevadas, até então indemnes. As alterações climáticas, que se caracterizam por invernos mais amenos na Europa Central e do Norte, têm sido implicadas nestas ocorrências (Gray, Dautel, Estrada-Peña, Kahl & Lindgren, 2008; Leschnik *et al.*, 2008). Com efeito, a temperatura média na Europa subiu cerca de 0,8°C no último século, todavia não de forma uniforme; a maior diferença regista-se nos invernos do norte europeu, o que favorece a redução da mortalidade dos vectores nestas regiões frias, dispondo-as assim à ocorrência das doenças associadas (Githeko, Lindsay, Confalonieri & Patz, 2000). Regiões não endémicas no norte da Europa poderão em breve enfrentar uma reclassificação epidemiológica quanto a doenças como a leishmaniose ou a babesiose caninas (Naucke & Lorentz, 2011; Øines, 2010). Por conta destas alterações climáticas, o risco de fixação generalizada de populações de vectores no norte europeu só poderá ser atenuado pela incerteza sobre como o aquecimento global afectará as populações de vectores nas regiões mais a sul (Semenza & Menne, 2009). Randolph (2004) e Gray *et al.* (2008) recordam também dois factores implicados na alteração das populações de vectores:

a diminuição dos terrenos cultivados e do uso de pesticidas na Europa, veio disponibilizar mais *habitats* para os vectores em geral, nomeadamente os ixodídeos.

As CVBD não demonstram apenas expansão para regiões indemnes, mas também re-emergem nas zonas endémicas. Um exemplo pode ser o caso da dirofilariose canina (figura 1). Nas áreas de baixa incidência da doença, o desenvolvimento de zonas residenciais urbanas potencia a prevalência ao alterar a drenagem natural dos solos, criando fontes de água disponível que favorecem o desenvolvimento dos mosquitos vectores. Com idêntico desfecho, as zonas urbanas caracterizam-se por um efeito de estufa artificial causado pela absorção de calor durante o dia e irradiação nocturna, o que cria microclimas que suportam o desenvolvimentos dos mosquitos vectores durante os meses frios, prolongando assim a janela de transmissão anual (American Heartworm Society, 2012).

**Figura 1** – Distribuição geográfica da dirofilariose canina 2001-2011: a vermelho zonas endémicas, a rosa zonas com casos esporádicos, a branco zonas sem informação (Morchón *et al.*, 2012).



Na última década é de facto evidente a expansão da dirofilariose canina pela Europa, desde casos esporádicos nas ilhas britânicas (Traversa, Di Cesare & Conboy, 2010), passando por um aumento considerável de casos endémicos na Europa de leste e península balcânica (Jacsó, 2009; Miterpáková *et al.*, 2010; Morchón *et al.*, 2012) até aos extremos orientais além do Mar Negro como o sul da Rússia (Kartashev, 2011). Os efeitos das alterações climáticas são vincados nesta doença: habilita mais zonas para a permanência de vectores, estende o período da sua actividade, encurta o período de desenvolvimento do parasita, enquanto prolonga a janela de transmissão anual (Morchón *et al.*, 2012).

Finalmente, os esforços progressivos de conservação de espécies silváticas no continente europeu parecem contribuir para a manutenção epidemiológica de grande parte das CVBD. Em Portugal, a detecção de vários destes agentes no lobo ibérico (*Canis lupus*) e na raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) é um exemplo de como o ciclo silvático pode contribuir como reservatório da infecção (Pereira da Fonseca *et al.*, 2003; Santos, Madeira de Carvalho, Pacheco & Fazendeiro, 2004; Ferreira, 2010).

Este alerta reflecte-se também entre os efectivos de cães polícias/militares, com alguns estudos de prevalência nestas populações a demonstrarem uma crescente aposta na profilaxia das CVBD.

## 2.2 – Os efectivos de cães polícias/militares e o Grupo de Intervenção Cinotécnico (GIC) da Unidade de Intervenção da GNR

A natureza das actividades dos cães de trabalho torna-os susceptíveis às CVBD pela frequente permanência em ambientes exteriores que, em muitos casos, incluem *habitats* oportunos para os vectores (Davoust, Toga, Dunan & Quilici, 1994). A relevância destes agentes nos efectivos de cães militares tem um episódio marcante durante a guerra do Vietname, no final dos anos sessenta do século XX. Na altura, milhares de cães das forças armadas dos Estados Unidos da América (EUA) foram destacados para o teatro de guerra, como sentinelas, batedores, pisteiros e sinalizadores de minas. Em 1968, uma afecção hemorrágica severa atingiu o efectivo, comprometendo a sua acção e culminando na morte de 250 animais. A doença foi associada a elevadas infestações por carraças da espécie *R. sanguineus* e nomeada pancitopénia hemorrágica tropical (Kelch, 1981). Nos dias de hoje esta é uma das CVBD mais frequentes a nível global, agora renomeada erliquiose monocítica canina, causada por *Ehrlichia canis*.

Em Portugal, o GIC, incluído na Unidade de Intervenção da GNR, tem como missão colocar ao serviço do país binómios (homem/cão) para o cumprimento de diversas missões. Os binómios estão preparados para actuar em acções de Manutenção da Ordem e Intervenção Táctica; detecção de odores químicos, papel-moeda, explosivos, armas, estupefacientes, agentes incendiários e policarbonato (*Compact Disk*: CD; *Digital Versatile Disc*: DVD); e no caso de binómios pisteiros, detecção de odor humano, vestígios biológicos e de cadáver. Os cães são adestrados para enfrentarem situações extremas, como o uso da força, o apoio às equipas de socorro e resgate em montanha, ou o combate à imigração ilegal na União Europeia. Estes animais estão assim sujeitos a variáveis epidemiológicas diferentes das do comum animal de companhia, sendo frequentes as movimentações em território nacional ou internacional, como missões nas fronteiras hispano-marroquina, greco-turca e húngaro-ucraniana (figura 4).

**Figura 2 – A:** GIC em cenário de montanha; **B:** detecção de vestígios hemáticos (GNR, 2012). **C:** Binómio em patrulha na margem do Rio Evros (fronteira greco-turca), no âmbito do combate à imigração ilegal, sob coordenação da Agência Europeia de Gestão da Cooperação Operacional nas Fronteiras Externas (FRONTEX, 2011)





## Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

### 1. Piroplasmose: *Babesia* e *Theileria*

Os protozoários do género *Babesia* têm um lugar de destaque na história das CVBD, precisamente por terem sido identificados como agentes da primeira doença infecciosa de transmissão vectorial. Em finais do século XIX, Victor Babeş identificou um agente patogénico em células sanguíneas de gado bovino que viria a ser denominado *Babesia bovis*. A revelação de que este se transmitia aos ruminantes através de carraças, constituiu o primeiro relato de um agente patogénico transmitido por um artrópode vector. Desde então, a babesiose foi amplamente descrita, identificando-se várias espécies e diferentes vectores de transmissão. A doença foi confirmada em hospedeiros como o cão e o ser humano e actualmente reconhece-se a sua distribuição a nível mundial (Uilenberg, 2006).

Os piroplasmas são classificados como protozoários da ordem Piroplasmida, incluídos no filo Apicomplexa, cujos membros são maioritariamente parasitas (Rich & Ayala, 2003). A ordem Piroplasmida compreende parasitas de eritrócitos em mamíferos, transmitidos por vectores artrópodes, e além do género *Babesia* inclui o género aparentado *Theileria*. Em conjunto, os dois parasitas são apelidados de piroplasmas, ou agentes etiológicos da piroplasmose. Os ciclos de vida são semelhantes: ambos transmitidos por carraças da família Ixodidae, invadem e destroem eritrócitos no hospedeiro, provocando um quadro típico de distúrbios hematológicos. Todavia, o ciclo biológico destes agentes difere o suficiente para que se estabeleça a distinção entre os dois géneros (Beltz, 2011).

#### 1.1. Ciclo de vida

Os ciclos de vida de *Babesia* e *Theileria* são complexos e incluem a rotação entre dois hospedeiros obrigatórios: um ixodídeo como hospedeiro definitivo e um vertebrado como hospedeiro intermediário (Bowman & Nutall, 2008). Quando a carraça vector adere ao hospedeiro, supõe-se um mínimo de 2 dias de alimentação para que os esporozoítos sejam transmitidos. Já na corrente sanguínea do cão, a *Theileria* invade primeiro as células linfóides, onde se multiplica por esquizogonia, e só posteriormente os eritrócitos. Já os esporozoítos de *Babesia* infectam exclusivamente os eritrócitos, onde ocorre a merogonia. Assumindo uma forma anelar inicialmente, o trofozoíto multiplica-se em pares de merozoítos, caracterizados pela típica forma de pêra/lágrima no género *Babesia*. Esta e eventuais subdivisões até 8 pares, levam à destruição do eritrócito e os merozoítos libertados infectarão novas células. A ingestão de eritrócitos infectados por uma carraça vector dará continuidade ao ciclo (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Na carraça a gametogonia culmina na formação de um zigoto alongado que penetra no epitélio intestinal, onde ocorre a multiplicação assexuada para estádios com mobilidade. Estes eventualmente migram para as glândulas salivares e, assim que a carraça adere ao hospedeiro, ocorre a

fase final da esporogonia com a formação dos esporozoítos. Nos géneros *Babesia* e *Theileria*, a esporogonia ocorre em cada estágio do ciclo de vida da carraça (larva, ninfa e adulto), garantindo a transmissão transestadial. Apenas nas espécies *Babesia*, o parasita atinge também os órgãos reprodutores da carraça, assegurando adicionalmente a transmissão transovárica entre gerações (Chauvin, Moreau, Bonnet, Plantard & Malandrin, 2009).

O progresso das últimas duas décadas trouxe também mais reformulações na compreensão desta doença, e as novas evidências epidemiológicas põem em causa a estrita especificidade que se supunha entre piroplasmas e os seus hospedeiros, bem como os vectores como via única de infecção (Chauvin *et al.*, 2009).

## **1.2. Etiologia e Epidemiologia**

No animal infectado, a identificação do parasita baseada na morfologia no eritrócito revela-se insuficiente para distinguir as diferentes espécies de *Babesia* ou *Theileria*. Historicamente, as espécies de *Babesia* foram sendo nomeadas conforme o tamanho na fase intra-eritrocitária e o hospedeiro que infectavam. Durante um longo período reconheciam-se apenas duas *Babesia* no cão: uma forma grande, *Babesia canis*, e uma forma pequena, *Babesia gibsoni* (Boozer & Macintire, 2003). Contudo, eram frequentes os casos em que perante diferentes infecções, a localização geográfica, os vectores de transmissão, a patogenicidade e as reacções de imunidade cruzada, não coincidiam entre si. Estas observações eram sugestivas de que pelo menos três subespécies da forma grande de *Babesia* parasitavam o cão: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*. (Carret *et al.*, 1999). Actualmente a maioria dos autores mantém a diferenciação morfológica das espécies com base no tamanho da forma intra-eritrocitária: as formas grandes (2,5-7µm) e as formas pequenas (1-3 µm); outros simplificam esta divisão, estipulando o critério na relação dimensional entre o parasita e o raio do eritrócito (Birkenheuer, 2012). Independentemente do critério, esta classificação morfológica carece de base genética (Bourdoiseau, 2006).

A disponibilidade de novas técnicas de biologia molecular permitiram ultrapassar esta diferenciação em apenas duas espécies e elucidou a distinção das subespécies de *Babesia canis*; de tal forma que assume-se já estas subespécies como na verdade três espécies distintas (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Os avanços na reclassificação taxonómica dos piroplasmas prosseguem, e vários autores afiançam a probabilidade de que novas espécies serão identificadas (Birkenheuer, Neel, Ruslander, Levy & Breitschwerdt, 2004; Irwin, 2009).

Actualmente descrevem-se já dez espécies infectantes no cão que embora por vezes morfológicamente indistinguíveis, são na verdade geneticamente singulares (tabela 1).

**Tabela 1** - Conhecimento actual das espécies de piroplasmas que infectam o cão, a sua morfologia no eritrócito, o(s) vector(s) de transmissão e a distribuição geográfica (adaptado de Birkenheuer, 2012).

Espécies	Morfologia no eritrócito	Vector	Geografia
<i>Babesia rossi</i>	Grande (2.4-3 x 4-7 µm), piriforme, singular ou par	<i>Haemaphysalis elíptica</i>	África
<i>Babesia canis</i>	Grande (2.4-3 x 4-7 µm), piriforme, singular ou par	<i>Dermacentor</i> spp. <i>R.sanguineus</i>	Europa
<i>Babesia vogeli</i>	Grande (2.4-3 x 4-7 µm), piriforme, singular ou par	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Mundial
<i>Babesia</i> sp.	Grande (2.5 x 5 µm), piriforme	Desconhecido	EUA
<i>Babesia gibsoni</i>	Pequena (1-2 x 3-4 µm), anelar, singular	<i>Haemaphysalis bispinosa</i> / <i>H. longicornis</i> ?	Mundial
<i>Babesia conradae</i>	Pequena (1-2.5 µm), singular, “cruz de Malta”	Desconhecido	EUA França
<i>Babesia microti-like</i>	Pequena (1-2.5 µm), singular	<i>Ixodes hexagonus</i> ?	Espanha, Itália, Croácia
<i>Babesia caballi</i>	Não descrito	Desconhecido	Croácia, França
<i>Theileria annulata</i>	Não descrito	Desconhecido	Espanha, França** Irão*
<i>Theileria equi</i>	Não descrito	Desconhecido	Espanha Croácia França**

\* Bigdeli, Rafie, Namavari & Jamshidi (2012)

\*\* Fritz (2010)

*Babesia rossi* é a espécie mais virulenta mas aparentemente restringida ao continente africano, onde é transmitida pela carraça *Haemaphysalis elíptica* (Allison, Yeagley, Levis & Reichard, 2011). Com relatos esporádicos nos restantes continentes, *Babesia canis* é a espécie mais prevalente na Europa. O vector principal é *Dermacentor reticulatus*, porém, há evidências que sugerem transmissão pela carraça *Rhipicephalus sanguineus*. *Babesia*

*vogeli* é descrita como a menos virulenta das três, é mais comum nas regiões quentes e húmidas, mas ocorre praticamente com distribuição mundial (Dixit, Dixit & Varshney, 2010). Principalmente transmitida por *R. sanguineus*, é provável que *Ixodes ricinus* partilhe o papel de vector deste agente (Iori *et al.*, 2010). Uma nova forma grande de *Babesia* foi identificada apenas nos EUA, filogeneticamente mais próxima da *Babesia bigemina* e *Babesia caballi* (Birkenheuer *et al.*, 2004). A hipótese de uma infecção oportunista foi naturalmente abandonada logo que mais infecções pelo mesmo parasita foram detectadas em vários cães (Sikorski *et al.*, 2010). A forma de transmissão do agente permanece desconhecida.

De forma análoga ao descrito para as formas grandes de *Babesia*, no passado todas as formas pequenas eram identificadas como *Babesia gibsoni* (Kjemtrup *et al.*, 2000; Zahler, Rinder, Schein, & Gothe 2000). A espécie *B. gibsoni*, descrita originalmente no continente asiático, provoca uma doença que é actualmente considerada em expansão a nível global, uma tendência que surpreendentemente pode estar relacionada com transmissão directa de cão para cão, via sangue infectado (Irwin, 2009). Suspeita-se que carraças do género *Haemophysalis* sejam vectores deste parasita em algumas regiões da Ásia, porém tanto na Europa como nos Estados Unidos, os casos têm vindo a aumentar sem que se reconheça um vector competente. A hipótese de transmissão directa entre cães via sangue infectado tem sido sustentada a nível global, com diversos estudos que estabelecem relação entre as interações agressivas e a transmissão do agente. Estudos nos EUA indicam uma alta prevalência nas raças American Staffordshire e Pitbull Terrier, reconhecidas pelo carácter agressivo e pelo constante uso em lutas de cães (Macintire *et al.*, 2002). No nordeste do Japão o clima é desfavorável ao desenvolvimento de carraças, no entanto, foram registadas altas prevalências de infecção por *B. gibsoni* em cães Tosa Inu, uma raça associada às lutas de cães (Irwin, 2007). Na Austrália, Jefferies *et al.* (2007) obtém resultados concordantes com esta teoria e estabelece como factores de risco para infecção por *B. gibsoni*, cães machos da raça Pitbull Terrier ou cães com história de mordedura por esta raça. Na Alemanha, os primeiros casos de infecção por *B. gibsoni* foram detectados em dois cães da raça Pitbull Terrier (Hartelt *et al.*, 2007). Também em países como a Croácia, Espanha e Itália, tem sido reportada uma elevada proporção destes cães positivos a *B. gibsoni* (Beck *et al.*, 2009; Tabar *et al.*, 2009; Trotta, Carli, Novari, Furlanello & Solano-Gallego, 2009). Experimentalmente a transmissão transplacentária do parasita também foi já demonstrada (Fukumoto, Suzuki, Igarashi & Xuan 2005).

Embora a morfologia das formas pequenas de *Babesia* seja semelhante, actualmente reconhecem-se mais espécies além de *B. gibsoni* (Criado-Fornelio, González-del-Río, Buling-Saraña & Barba-Carretero, 2003c). A *Babesia conradae* é uma das novas formas pequenas, até hoje isolada apenas nos EUA e em França. Durante algum tempo considerada *Babesia gibsoni*, a sequenciação genética demonstrou que se trata de uma espécie distinta, filogeneticamente mais próxima de piroplasmas do género *Theileria* (Irwin,

2005). Foi levantada a hipótese de *R. sanguineus* ser o vector responsável pela sua transmissão, no entanto sem sustentação em resultados de transmissão experimental (Kjemtrup, Wainwright, Miller, Penzhorn & Carreno, 2006). Cicco *et al.* (2012) documentam um novo surto de *B. conradae* no sul da Califórnia afectando 12 cães, nos quais se detectaram carraças da espécie *R. sanguineus* e *Ornithodoros* sp. Estes dados reforçam a percepção de *R. sanguineus* como vector e lançam *Ornithodoros* sp. na equação epidemiológica. No norte de Espanha, outra pequena *Babesia* distinta de *B. gibsoni*, filogeneticamente mais próxima da *Babesia microti*, tem sido sucessivamente isolada em várias amostras de cães de ambiente rural e urbano (Zahler *et al.*, 2000; García 2006). A falta de dados sobre o ciclo de vida não permite enquadrar o parasita na definição de *Babesia* ou *Theileria*. *Theileria annae*, *Babesia annae* ou *Babesia microti-like* foram as denominações atribuídas para esta espécie, porém na actual ausência de consenso, neste trabalho refirimo-nos ao organismo como *Babesia microti-like* (Birkenheuer, 2012). A carraça *Ixodes hexagonus* tem sido sugerida como vector de transmissão ao cão (Zahler *et al.*, 2000; Birkenheuer *et al.*, 2010). Também em Espanha, vários cães provenientes de diferentes regiões do território acusaram infecção por *Theileria equi* e *Theileria annulata*, formas pequenas que se supunham específicas de equinos e bovinos, respectivamente (Criado-Fornelio, Martinez-Marcos, Buling-Saraña & Barba-Carretero, 2003a; Criado *et al.* 2006). A ausência de sintomas na maior parte dos infectados pode ser indicativa de baixa patogenicidade no hospedeiro canino, contudo surgem em França e na Croácia mais casos de infecção em cães com sintomatologia (Beck *et al.*, 2009; Fritz, 2010). Adicionalmente, ambos os autores reportam um total de três casos de cães sintomáticos, mas desta feita infectados por *Babesia caballi*. Os vectores que inoculam estes parasitas no cão não estão para já definidos, contudo é sabido que tanto *T. equi* como *B. caballi* são transmitidas por carraças dos géneros *Rhipicephalus* e *Dermacentor* (Dixit, Dixit & Varshney, 2010).

Estes dados reformulam indubitavelmente o número de piroplasmas aptos a provocarem doença no cão, põem em evidência a baixa especificidade de *Babesia* e *Theileria* em relação aos hospedeiros, e lançam vias alternativas à transmissão dos agentes. Apesar de partilharem características semelhantes, as variações de virulência entre as espécies de piroplasmas devem ser consideradas na definição do diagnóstico, prognóstico e terapêutica (Birkenheuer, 2012).

### **1.3. Patologia e quadro clínico**

A babesiose canina pode manifestar-se de forma hiperaguda, aguda, subclínica ou crónica, consoante a espécie infectante e a susceptibilidade do hospedeiro. Contribuem para esta susceptibilidade factores como a idade, imunodepressão, esplenectomia, e infecção ou doença concomitante (Boozer & Macintire, 2003). A rara infecção hiperaguda está associada a extenso dano tecidual e altas taxas de mortalidade nos primeiros dias, sobretudo em cães jovens (Irwin, 2010). A maioria dos casos manifesta-se porém de forma aguda, tipicamente

caracterizada por febre, letargia, anorexia, mucosas pálidas, esplenomegália, anemia hemolítica e trombocitopénia (Yeagley *et al.*, 2009; Ayoob, Hackner & Prittie, 2010). Nestes casos, o quadro clínico parece decorrer essencialmente da hemólise aguda e considera-se estar perante babesiose não complicada (Matijatko *et al.*, 2009). Já os casos em que ocorrem distúrbios sistémicos que induzem quadros de maior gravidade, são classificados como babesiose complicada. Os distúrbios sistémicos mais frequentes incluem insuficiência renal aguda, coagulopatia, hepatopatia e icterícia, pancreatite, choque e disfunção do sistema nervoso central.

Os quadros mais severos de doença são particularmente característicos da *B. rossi* (Birkenheuer, 2012). Por comparação, *B. canis* induz um quadro clínico muito variável, mas geralmente caracterizado por uma forma aguda típica não complicada, com menor grau de parasitemia e melhor prognóstico (Boozer & Macintire, 2003). Infecções por *Babesia microti-like* indiciam também elevado grau de patogenicidade com anemia severa e trombocitopénia como achados mais frequentes, em 30 a 40% dos casos acompanhados de insuficiência renal aguda (Garcia, 2006). Nos poucos casos descritos, a nova grande *Babesia* sp. isolada nos EUA demonstra uma expressão clínica semelhante à de *B. canis* (Birkenheuer *et al.*, 2004). Os cães infectados por *B. gibsoni* são na sua maioria portadores assintomáticos, porém casos de anemia severa têm sido reportados. As infecções por *B. vogeli* têm igualmente uma evolução leve a moderada, caracterizada por febre por vezes sem alterações hematológicas. (Birkenheuer, 2012). Com escassa informação disponível, a infecção por *B. conradae* permite identificar um padrão de vômito, associado a letargia, anorexia, febre, mucosas pálidas, anemia hemolítica e trombocitopénia (Birkenheuer, 2012). A patogenia da doença envolve essencialmente distúrbios hematológicos, cuja evolução está normalmente associada ao grau de parasitemia. Além destas alterações, pensa-se que os distúrbios sistémicos decorrem sobretudo devido à resposta imune do hospedeiro (Ayoob *et al.* 2010). Nas várias espécies de babesia têm sido demonstrados mecanismos que lhes permitem limitar ou mesmo evitar esta resposta. Demonstrou-se que as proteínas de superfície envolvidas na adesão ao eritrócito apresentam elevada variabilidade entre espécies, e até mesmo intra-espécie, resultando num polimorfismo antigénico favorável à persistência no hospedeiro. Adicionalmente, os parasitas exibem capacidade de aderência ao endotélio, retendo os eritrócitos infectados na microvasculatura o que previne a sua passagem pelo baço e consequente eliminação (Chauvin *et al.*, 2009). A incapacidade em eliminar permanentemente o parasita pode tornar o hospedeiro um portador crónico. Neste estado os agentes permanecem sequestrados nos capilares, sendo libertados periodicamente para a circulação (Shaw & Day, 2005). As consequências clínicas da infecção crónica são ainda pouco claras; os cães apresentam febre intermitente, diminuição do apetite e deterioração do estado geral. A forma crónica pode entretanto evoluir para uma forma subclínica em que as manifestações surgem perante situações de *stress*,

imunodepressão ou esplenectomia (Adaszek, Martinez & Winiarczyk, 2011). Apesar do risco de recidiva, a maioria dos cães tolera este estado de premunição sem manifestações clínicas, o que se torna vantajoso em zonas endémicas (Taboada & Lobetti, 2006). Contudo, este estado coloca um alerta sobre os dadores sanguíneos ou animais exportados/transportados para zonas não endémicas (Irwin, 2007).

#### **1.4. Diagnóstico**

Todos os procedimentos técnicos disponíveis apresentam limitações em determinadas circunstâncias, e as recentes alterações na etiologia e epidemiologia da doença, tornam o diagnóstico mais complexo (Birkenheuer, Levy & Breitschwerdt, 2003). Desde os procedimentos simples, como esfregaço sanguíneo, até à análise serológica ou molecular, o diagnóstico da piroplasmose compreende necessariamente o contexto do animal. Geralmente, a combinação de informação proveniente da história pregressa, do quadro clínico e da localização geográfica, é razoavelmente preditiva de piroplasmose (Birkenheuer, 2012). A transmissão vectorial, e a possível ocorrência de transmissão horizontal, impõem que se questione o proprietário sobre infestação por carraças, transfusões sanguíneas, ou mordeduras nas 4-8 semanas precedentes, independentemente da raça (Irwin, 2007).

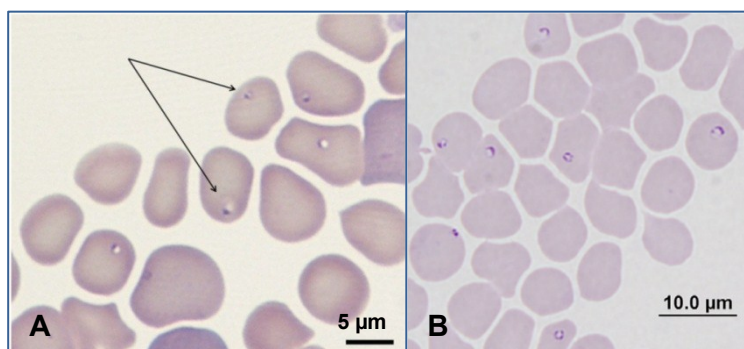
A avaliação laboratorial hematológica revela predominantemente trombocitopenia e anemia. Vários autores apontam trombocitopenia moderada a severa como a alteração hematológica mais característica de babesiose canina, tanto que, na sua ausência a doença torna-se improvável (Kettner, Reyers & Miller, 2003; Schoeman, 2009; Ayoob *et al.* 2010). A anemia é inicialmente moderada, não regenerativa, normocítica e normocrómica, que frequentemente progride para uma anemia regenerativa macrocítica e hipocrómica. Alterações no leucograma não são tão comuns e podem ser bastante variáveis, desde leucocitose ou leucopenia, neutrofilia ou neutropenia, linfocitose e eosinofilia (Furlanello *et al.* 2005).

A bioquímica sérica e urinálise podem registar alterações relacionadas com a gravidade da doença, particularmente com o grau de hipóxia dos tecidos. Os achados mais comuns incluem aumento da aspartato aminotransferase (AST), da alanina aminotransferase (ALT), da fosfatase alcalina sérica (FAS), hiperbilirrubinémia, hipoalbuminémia, e distúrbios no equilíbrio ácido-base (Furlanello *et al.*, 2005). À ecografia, esplenomegália é um achado comum (Fraga *et al.*, 2011). A imagiologia pode contribuir para o acompanhamento do tratamento mas carece de valor de diagnóstico.

Na verdade, nenhum dos sinais clínicos ou achados laboratoriais é patognomónico de babesiose canina. O diagnóstico definitivo obtém-se pela detecção dos parasitas intra-eritrocitários em esfregaço sanguíneo, o método de diagnóstico mais acessível em muitas regiões endémicas onde é habitualmente operada por técnicos experientes perante sinais compatíveis com a doença (Hunfeld, Hildebrandt & Gray, 2008). Ao microscópio as formas grandes de *Babesia* surgem no eritrócito sob a forma típica de pêra ou lágrima, com cerca de 2,5 x 5 µm, coradas de azul com núcleo roxo escuro. Geralmente singulares, ou em par,

alguns eritrócitos estão infectados com até 8 merozoítos (Valden, Knoll, Smith & Tilley 2009). Devido à dimensão e pleomorfismo, a observação das formas pequenas pode ser mais difícil; *B. gibsoni* e *B. microti-like* surgem normalmente isoladas em anéis delgados com um núcleo excêntrico, com cerca de 1 x 2.5 µm, mas também em forma de coco ou bacilo (figura 2) (Boozer & Macintire, 2005; Simões, Cardoso, Araújo, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2011). *Babesia conradae*, apesar de semelhante à *B. gibsoni*, forma tétradas de merozoítos no interior do eritrócito, comumente designadas forma em cruz de malta (do inglês *maltese cross*) (Kjemtrup & Conrad, 2006b).

**Figura 3** – Esfregaço sanguíneo de canídeo (1000x): **A** - *B. microti-like* (Simões *et al.*, 2011); **B** - *B. gibsoni* (Irwin, 2010)



A coloração mais referenciada na detecção de piroplasmas são os derivados do método de Romanowsky, como a coloração de Giemsa, usada neste trabalho. Além da detecção dos piroplasmas, que estabelece o diagnóstico, os achados do esfregaço sanguíneo são por norma concordantes com o quadro clínico do paciente. Anisocitose, policromasia e reticulocitose estão normalmente presentes no esfregaço, em concordância com a anemia hemolítica em regeneração. Corpos de Heinz e corpúsculos de Howell-Jolly estão descritos, associados a anemias mais severas (Camacho, Pallas, Gestal, Guitian & Olmeda, 2001).

A observação microscópica permite aferir a morfologia do parasita, porém o fenótipo não esclarece a espécie de piroplasma em causa (Irwin, 2007). Adicionalmente, é sabido que as fases eritrocitárias do parasita podem estar substancialmente reduzidas, ou aparentemente ausentes em hospedeiros crônicos, o que exige um exame moroso do esfregaço, muitas vezes sem sucesso (Cacciò *et al*, 2002).

Os métodos serológicos providenciam uma boa forma de detecção num portador crônico. Destes, a IFI é o mais comum, que tal como os restantes testes serológicos, não permite a distinção entre uma infecção aguda ou crônica (Irwin, 2007). Geralmente os anticorpos surgem 8 a 10 dias pós-infecção e títulos acima de 1:320 associados a sinais clínicos compatíveis são suficientes para estabelecer o diagnóstico. Segundo Bobade, Oduye & Aghomo (1989), os títulos de anticorpos são menores nos animais jovens e a seroconversão nem sempre ocorre. Por outro lado, os anticorpos podem permanecer no animal mesmo após a eliminação do agente e, neste caso, dar origem a falsos positivos (Kirtz, Leschnik, Hooijberg, Tichy & Leidinger, 2010). Além disso, as reacções cruzadas entre espécies de *Babesia* impossibilitam a sua discriminação.



É consensual que os métodos de PCR são actualmente os testes mais sensíveis e largamente os mais específicos na detecção de piroplasmas caninos, mesmo em situações de baixa parasitemia como infecções subclínicas. Por outro lado, na perspectiva global a acessibilidade a estes métodos permanece ainda restrita, sobretudo quando comparada com o esfregaço sanguíneo (Irwin, 2007).

### **1.5. Tratamento, profilaxia e saúde pública**

Na Europa o fármaco mais difundido na eliminação das formas grandes de *Babesia* é o dipropionato de imidocarb, presentemente o único babesicida que revela capacidade em eliminar de forma consistente os parasitas do organismo (Terkawi & Igarashi, 2011). A imunidade adquirida após infecção por *B. canis* aparenta ser eficaz na protecção contra re-infecção homóloga por um período de 5-8 meses até 1 ano, porém é limitada além deste período e comprovadamente ineficaz contra infecções heterólogas (Brandão, Hagiwara & Myiashiro 2003; Schetters, 2011). O imidocarb está também indicado nos casos em que se pretende uma terapêutica profilática como demonstrado contra infecções por *B. canis*, com um período de protecção de 4-6 semanas (Bourdoiseau, 2006). Quando o tratamento pelo dipropionato de imidocarb se revela ineficaz nos cães, a identificação da espécie ou estirpe está recomendada (Fritz, 2010). As diversas espécies de *Babesia* demonstram diferentes reacções ao tratamento, sendo consensual que as formas pequenas exibem maior resistência à terapêutica com maior probabilidade de resultar em infecção crónica (Boozar & Macintire, 2003). A combinação de atavaquona e azitromicina é uma das abordagens mais eficazes na resolução da doença causada por *B. gibsoni*. A eficácia deste protocolo é apenas questionada pela expectável parasitemia persistente e risco de desenvolvimento de resistências (Trotta *et al*, 2009; Birkenheuer, 2012). Como alternativa a algumas destas limitações, Suzuki *et al.*, (2007) propõe um protocolo baseado na combinação de clindamicina, metronidazol e doxiciclina, que supõe ser menos predisposto a recidiva ou ao desenvolvimento de resistências, porém com resultados terapêuticos mais lentos. O mesmo protocolo é recomendado na resolução de babesiose por *B. conradae* (Cicco *et al*, 2012). A informação sobre o tratamento nas novas espécies de piroplasmas descritas no cão é ainda reduzida. A nova forma grande detectada nos EUA parece susceptível aos protocolos de imidocarb e de azitromicina/atavaquona. (Birkenheuer, 2004; Sikorski *et al*, 2010). Nos casos descritos de *Babesia microti*-like o imidocarb parece pouco eficaz e as alternativas carecem por enquanto de ensaios terapêuticos (Garcia, 2006).

A melhor forma de prevenir a babesiose canina é evitar a exposição do animal aos vectores da doença, um objectivo que estimula a aplicação tópica de acaricidas combinada com uso de coleiras repelentes. Nos casos em que a infestação é detectada, a remoção da carraça nas primeiras 24h deverá evitar o desenvolvimento da doença, dado o período de 2-3 dias necessário para que os esporozoítos sejam injectados na corrente sanguínea do hospedeiro. Também no sentido de reduzir o risco de contaminação por sangue infectado,

outras medidas incluem ainda cuidados acrescidos nas vacinações, corte de caudas, ou situações de agressão, em estabelecimentos de acolhimento com numerosos animais (Boozer & Macintire, 2003). Nestes e noutros casos, a prevenção passa necessariamente pelo controlo de vectores no ambiente. Fipronil e piretrinas (entre as quais as permetrinas), são os compostos mais recomendados no controlo químico destes agentes (Petney *et al.*, 2011). Neste contexto alguns autores salientam a importância de repensar as estratégias de prevenção baseadas exclusivamente na aplicação de químicos. Com efeito, salvo determinadas excepções, raramente será razoável considerar a total erradicação das carraças do meio. Além do potencial desenvolvimento de resistência nos vectores, a suspensão do equilíbrio enzoótico por contínua aplicação destes compostos pode acarretar consequências insustentáveis a nível ambiental, económico e epidemiológico (Peter, Van den Bossche, Penzhorn & Sharp, 2005; Dantas-Torres, 2008). Peter *et al.* (2005) apontam para um futuro controlo da doença e dos vectores baseado no desenvolvimento de vacinas contra ambos agentes, aplicadas no seio de uma estratégia de manutenção da estabilidade enzoótica, ao invés da erradicação.

A variação antigénica entre as várias espécies impede a protecção cruzada e dificulta a criação de uma vacina extensivamente eficaz. As duas vacinas actualmente disponíveis no mercado europeu, baseadas em antigénios solúveis do parasita (ASP), são vacinas anti-doença, no sentido em que não prevenindo a infecção, actuam apenas na redução da anemia e gravidade dos sinais clínicos (Schetters, 2011). O futuro da vacinação poderá passar pela elaboração da imunidade a partir de um polipéptido específico do parasita que previne a infecção e/ou o desenvolvimento de doença (Schetters, 2012). Actualmente, no mercado português estão disponíveis vacinas contra *B. canis* (Pirodog®) e contra a associação *B. canis* e *B. rossi* (Nobivac Pro®).

Tal como descrito na epidemiologia dos piroplasmas caninos, hoje em dia reconhecem-se mais espécies envolvidas na babesiose humana do que anteriormente se supunha. Se na Europa e nos EUA a doença é ainda predominantemente atribuída à *Babesia divergens* e *Babesia microti*, respectivamente, mais espécies têm sido identificadas em seres humanos (Hubálek & Rudolf, 2011). Algumas destas espécies zoonóticas têm os seus principais hospedeiros reservatórios entre a fauna silvestre, como tal, tanto o aumento das populações de veados na Europa, como os padrões de migração de outros hospedeiros, podem constituir um risco epidemiológico para indivíduos susceptíveis. Humanos esplenectomizados, imunodeprimidos e idosos estão mais associados a um quadro clínico grave. À medida que a população humana se torna progressivamente mais susceptível à infecção, pelo aumento do número de indivíduos imunodeprimidos, admite-se que os piroplasmas zoonóticos assumam considerável importância nos próximos anos (Yabsley & Shock, 2013).

## 2. Hemoplasmose: *Mycoplasma haemocanis* e “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”

O género *Mycoplasma* compreende bactérias pertencentes à classe Mollicutes que evidenciam algumas características distintivas: maioritariamente anaeróbias facultativas são as mais pequenas células procarióticas capazes de reprodução binária. As reduzidas capacidades bio sintéticas tornam os *Mycoplasma* spp. parasitas obrigatórios. Pensava-se que este género compreendia apenas parasitas das membranas mucosas, porém, o recente reconhecimento dos micoplasmas hemotrópicos veio alterar esta realidade. Os micoplasmas hemotrópicos aderem aos eritrócitos e são capazes de infectar vários hospedeiros mamíferos. (Slonger & Post, 2005).

### 2.1. Etiologia e epidemiologia

A espécie *Mycoplasma haemocanis* é reconhecida desde 1928, mas por conta de algumas das suas características biológicas e fenotípicas, durante décadas foi classificada como *Haemobartonella canis*, incluída na família *Anaplasmataceae*, assim como outros organismos aparentados como *Haemobartonella felis* ou o *Eperythrozoon suis* (Venable & Ewing, 1968). Porém, a incerteza sobre a classificação dos géneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* como rickettsias era sustentada por outras características biológicas, como o reduzido tamanho, a ausência de parede celular, ou a ausência de tropismo intracelular (Messick, 2004). Na sequência de vários trabalhos baseados na sequenciação do gene rRNA 16S, são entretanto apresentadas propostas de alteração taxonómica em que as espécies dos géneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* passam a ser designadas pelo género *Mycoplasma*, incluído na Família *Mycoplasmataceae* da classe Mollicutes. Hemoplasma torna-se uma terminologia geral para estes organismos, amplamente usada por vários autores (Neimark, Johansson, Rikihisa, & Tully, 2001; Messick, Walker, Raphael, Berent, & Shi, 2002). Recentemente, Peters *et al.* (2008) reforçam esta conclusão e verifica que os hemoplasmas formam de facto um grupo distinto dentro do género *Mycoplasma*.

Enquanto possíveis alterações nos taxa não ocorrem, é usado o prefixo “haemo” para designar os parasitas eritrocitários do género *Mycoplasma*; e o termo *Candidatus* é entretanto reservado para espécies ainda não cultivadas. No gato reconhecem-se actualmente o *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (Willi *et al.*, 2007). Até 2005, *M. haemocanis* era o único hemoplasma identificado no cão, incluído no grupo *Haemofelis*, juntamente com *M. haemofelis* e *M. haemomuris*, parasitas do gato e do rato respectivamente. *M. haemocanis* é frequentemente observado formando cadeias sobre os eritrócitos, algo não descrito para *M. haemofelis* (Birkenheuer, Breitschwerdt, Alleman & Pitulle, 2002). Recentemente foi identificado no cão um novo hemoplasma, mais pequeno que *M. haemocanis*, que não forma cadeias sobre os eritrócitos (Sykes, Ball, Bailiff, & Fry, 2005). A comparação genética com os hemoplasmas conhecidos permitiu concluir que este é mais próximo de “*Candidatus*

*Mycoplasma haemominutum*", parasita do gato e incluído no grupo *Haemosuis*, tanto a nível morfológico como filogenético. O novo hemoplasma viria a ser designado de "*Candidatus* *Mycoplasma haematoparvum* e incluído na actual árvore filogenética dos hemoplasmas. Tasker *et al.* (2003) analisaram sangue extraído de cães e gatos provenientes de quatro continentes (Europa, Ásia, África e Oceânia); os resultados da análise molecular não só coincidem com a diferenciação entre as espécies que parasitam o cão e o gato, como verificam que os hemoplasmas têm praticamente distribuição mundial.

Estudos de prevalência de hemoplasmas na Europa têm revelado que a infecção por estes organismos é mais comum do que anteriormente se pensava, com índices de infecção que frequentemente atingem 20-40% dos animais testados. Por comparação, a ocorrência parece relativamente mais rara no continente americano e quase sempre associada a animais com doença evidente (Compton, Maggi & Breitschwerdt, 2012). Na Europa o maior número de casos regista-se entre os países com climas mais quente ou endémicos a *R. sanguineus* (Hulme-Moir, Barker, Stonelake, Helps & Tasker, 2010). Na verdade, o modo de transmissão dos hemoplasmas não é totalmente conhecido, contudo é geralmente aceite que esta carraça desempenha o papel de vector no cão (Hornok *et al.*, 2010). Experimentalmente comprovada, a transmissão através de *R. sanguineus* é ainda suportada pelas evidências epidemiológicas. Na Suíça, a grande maioria do território não apresenta as condições climáticas propícias ao desenvolvimento da carraça, contudo, num estudo de prevalência de hemoplasmas em 899 cães residentes no país, a maioria dos infectados tinha recentemente visitado países onde esta carraça é endémica (Wengi *et al.*, 2008).

Meios de transmissão alternativos têm sido aferidos, embora sem resultados concordantes. Woods, Wisnewski & Lappin (2006) e Willi *et al.* (2007b), verificam a presença de ADN de hemoplasma em pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*, questionando o papel destes agentes como vectores de hemoplasmas felinos. Alguns estudos fornecem evidências de transmissão por ingestão ou inoculação de sangue infectado (Willi *et al.*, 2007b; Kemming *et al.* 2004b). A detecção destes agentes nas glândulas salivares do gato, bem como a maior prevalência em gatos machos, com acesso à rua, ou que apresentam lesões de mordedura, sustenta a hipótese de que as interacções agressivas entre gatos possam constituir um factor de transmissão nos hemoplasmas (Dean, Helps, Jones, & Tasker 2008). Experimentalmente, gatos inoculados com *M. haemocanis* permanecem assintomáticos, porém, cães esplenectomizados inoculados com sangue de gato infectado desenvolvem bacteriemia, o que sugere o gato como fonte de infecção para o cão (Willi *et al.*, 2007a). Museux *et al.* (2009) confirma a transmissão através do sangue infectado inoculado a nível sub-cutâneo, reforçando a ideia que as interacções violentas nos cães e nos gatos devem ser consideradas factor de risco. Adicionalmente, a transmissão vertical por via transplacentária é uma suspeita já levantada nos hemoplasmas que infectam outros hospedeiros, porém carece ainda de confirmação (Willi *et al.*, 2007b; Pentecost *et al.*, 2012).

## 2.2. Patologia e quadro clínico

No cão, as manifestações clínicas da infecção por hemoplasmas não são muito comuns e a maior parte dos animais saudáveis permanece assintomático, o que limita o conhecimento sobre a evolução da doença e as terapêuticas a aplicar (Hulme-Moir *et al.*, 2010).

Pensa-se que a patogenia da doença se relacione com as interações na superfície dos eritrócitos. Foram identificados genes que codificam adesinas e sabe-se que os hemoplasmas se estabelecem em depressões à superfície do eritrócito, aderindo a estes por meio de fibrilas. Num estudo relacionado com *M. haemosuis*, observou-se que as depressões causadas por este agente alteram o citoesqueleto do eritrócito induzindo fragilidade celular. Com efeito, a microscopia electrónica revela que os hemoplasmas induzem alterações consideráveis na morfologia do eritrócito, o que não só compromete a célula em si, como também a perfusão microvascular e as trocas gasosas a nível tecidual

Usualmente a doença manifesta-se por episódios de anemia hemolítica, de moderada a severa, sobretudo em animais esplenectomizados ou imunodeprimidos. O modo como os hemoplasmas despoletam anemia hemolítica imuno-mediada no hospedeiro, tem sido estudada sem resultados concretos (Huebner, Vahlenkamp, Müller & Langbein-Detsch, 2006). Os casos reportados para infecção com *M. haemocanis* indicam que os sinais são geralmente discretos e a maioria dos cães apresenta infecção crónica assintomática. Actualmente apenas se reconhecem episódios de doença aguda consequentes de condições subjacentes como imunodepressão, parvovirose, linfossarcoma, esplenectomia ou co-infecção com outros hemoparasitas, como *Babesia canis* ou *Ehrlichia* spp. (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, & Stackebrandt, 2006). Na forma aguda, os sinais mais comuns são mucosas pálidas, inapetência, letargia, anorexia, perda de peso e febre. A demonstração inicial destes sinais pode surgir num período de 15 dias ou até 2 a 3 meses após inoculação (Kemming *et al.*, 2004b).

## 2.3. Diagnóstico

Geralmente decorre tempo suficiente entre o desenvolvimento da anemia e o reconhecimento da doença para que nesta altura se evidencie a resposta regenerativa da medula. Os achados laboratoriais incluem: reticulocitose com policromasia elevada e anisocitose; eritrócitos nucleados circulantes e corpos de *Howel-Jolly*. Trombocitopenia pode ocorrer associada a distúrbios hemorrágicos (Kemming *et al.*, 2004b). No caso de infecções latentes podem não ocorrer alterações laboratoriais (Messick & Harvey, 2012).

A identificação de hemoplasmas em esfregaços sanguíneos requer um protocolo cuidado na sua elaboração de forma a prevenir a ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos. O esfregaço sanguíneo deve apresentar uma fina camada de eritrócitos, sobejamente espaçados entre si, bem corados e sem artefactos. A coloração de Giemsa é a mais apontada, ao passo que a coloração Diff-Quick apresenta piores resultados na identificação de hemoplasmas (Slonger & Post, 2005). A tendência singular de *M. haemocanis* formar

cadeias de múltiplos organismos ao longo da superfície do eritrócito facilita o diagnóstico desta espécie. Comparativamente, "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*", é mais pequeno, descrito com um tamanho de 0,3 µm (o *M. haemocanis* varia de 0,3 µm a 2,0 µm) e a formação de cadeias não está descrita nesta espécie (Messick & Harvey, 2012). Em qualquer dos casos, a identificação por esfregaço sanguíneo é difícil e carece de sensibilidade em infecções assintomáticas (Kemming *et al.*, 2004a).

Dada a impossibilidade de cultivar hemoplasmas *in vitro*, o esfregaço sanguíneo foi durante muito tempo o único método de detecção de hemoplasmas. Porém, pelas razões descritas, hoje em dia é consensual entre os vários autores que este método apresenta baixa sensibilidade e o PCR foi admitido como o *gold standard* (Willi *et al.*, 2007a). É no entanto fundamental que a análise preceda a instituição da antibioterapia, uma vez que esta pode ser uma causa de falsos negativos neste método (Willi *et al.*, 2010). Poucos autores reportam o uso de testes serológicos para a detecção de anticorpos anti-*M. haemocanis*. A IFI com base na reacção cruzada com *Rickettsia connori*, é desaconselhada face aos melhores resultados do PCR (Kemming *et al.*, 2004a).

#### **2.4. Tratamento, profilaxia e saúde pública**

Estudos mais aprofundados sobre a terapêutica a instituir na hemoplasmosse canina ainda são necessários e de momento não existem dados relativos à eficiência de qualquer tratamento para "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*". O tratamento recomendado por Messick & Harvey (2012) para *M. haemocanis* envolve antibioterapia com base em tetraciclinas. No entanto, os estudos disponíveis sobre a eficácia deste tratamento em infecções por *M. haemocanis* confirmam a resistência deste agente, já antes verificada noutros hemoplasmas do gato. Após o início da antibioterapia há remissão dos sinais clínicos nos animais infectados, porém, a análise molecular demonstra a persistência do agente no hospedeiro ao longo da terapêutica e após o término desta, por um período até superior a um ano (Hulme-Moir *et al.*, 2010; Wengi *et al.*, 2008). Estes resultados sustentam que hospedeiro se torna portador crónico da infecção, uma hipótese que tem sido levantada por vários autores desde há décadas. Com base em estudos sobre a terapêutica aplicada contra *M. haemofelis*, alguns autores recomendam também o uso de fluoroquinolonas, como a enrofloxacin e a marbofloxacin. A eficácia destes fármacos revela-se semelhante à das tetraciclinas: apesar dos bons resultados na redução da parasitemia e dos sinais clínicos associados, não garantem a eliminação total do agente (Willi *et al.*, 2010).

Enquanto o modo de transmissão nos cães não é convenientemente aferido, a profilaxia deve ser direccionada para a prevenção do contacto com artrópodes hematófagos (Messick & Harvey, 2012). As implicações da hemoplasmosse para a saúde pública carecem de investigação. O potencial zoonótico dos hemoplasmas suscita investigação, no seguimento do isolamento de *M. haemofelis* e *M. haemosuis* em pacientes humanos, baseado em técnicas de biologia molecular (Willi *et al.*, 2010).

### 3. Hepatozoonose: *Hepatozoon canis*

#### 3.1. Ciclo de vida, etiologia e epidemiologia

A hepatozoonose é uma CVBD causada por um protozoário aparentado com os piroplasmas, classificado no filo Apicomplexa (Baneth *et al.*, 2003). O género *Hepatozoon* contém mais de 300 espécies, entre as quais *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum* constituem os agentes de hepatozoonose no cão. *H. americanum* ocorre apenas na América do Norte enquanto *H. canis* se distribui pelos restantes continentes, com excepção da Oceânia (Holman & Snowden, 2009).

Todas as espécies de *Hepatozoon* partilham um ciclo de vida básico que inclui a alternância entre o desenvolvimento sexual e esporogonia num invertebrado hematófago como hospedeiro definitivo, e a merogonia seguida de gametogonia num hospedeiro intermediário vertebrado. No caso da hepatozoonose canina, ao contrário da maioria dos agentes inoculados por vectores hematófagos durante a refeição sanguínea, *H. canis* é transmitido quando o canídeo ingere uma carraça da espécie *R. sanguineus* contendo o parasita. No intestino do cão os esporozoítos de *H. canis* são libertados e invadem a parede intestinal e atingem os órgãos sistémicos, via sistema circulatório, onde ocorrerá a formação de merozoítos. Este estágio posteriormente coloniza leucócitos e monócitos, diferenciando-se em gametócitos, que serão ingeridos pela carraça quando esta se alimenta no hospedeiro canino infectado (Bowman, 2009).

Além de *R. sanguineus* supõe-se que mais espécies de carraças estejam implicadas na epidemiologia da hepatozoonose canina, enquanto outros modos de transmissão já demonstrados incluem a transmissão intra-uterina e a transmissão predatória, para o *H. canis* e *H. americanum*, respectivamente (Baneth, 2011).

#### 3.2. Patologia e quadro clínico

Quando são libertados no intestino do hospedeiro canino, os esporozoítos penetram na parede intestinal e através do sistema circulatório migram para os órgãos hemolinfáticos como o baço, a medula óssea e os linfonodos; nalguns casos podem atingir outros órgãos como o fígado, rim e pulmões, provocando hepatite, glomerulonefrite e pneumonia (Baneth, 2012).

A patogénese da hepatozoonose canina é influenciada pela resposta imune do hospedeiro e co-infecção por outros agentes (Baneth, 2012). Geralmente as infecções por *H. canis* apresentam-se numa de três formas em associação com o grau de parasitemia: de forma sub-clínica (a mais comum), aguda (eventualmente fatal) e crónica (com fases de expressão clínica e remissão). Como tal, os sinais clínicos são geralmente variados e inespecíficos, como anemia, caquexia, letargia e febre de origem desconhecida (Ivanov & Tsachev, 2008). A forma aguda de hepatozoonose está associada a elevado grau de parasitemia ou doença concomitante (Karagenc *et al.*, 2006).

### 3.3. Diagnóstico

Os achados laboratoriais incluem (por ordem de relevância) anemia normalmente normocítica e normocrômica, leucocitose neutrofílica associada a elevada carga parasitária e trombocitopénia. O diagnóstico definitivo de infecção por *H. canis* surge pela observação microscópica do parasita em esfregaços sanguíneos. Os gamontes podem ser detectados ocupando o citoplasma de monócitos ou neutrófilos, de coloração azulada clara, com forma oval e cerca de 5 µm de largura por 10 µm de comprimento (Allison & Meinkoth, 2010). A literatura refere níveis de parasitémia que podem variar, desde indetectáveis, a elevados e facilmente observáveis. Em geral, a gravidade da doença acompanha esta variância (Ivanov & Tsachev, 2008)

Técnicas serológicas, como a IFI ou o ELISA, estão descritas com idênticos resultados, ambos de sensibilidade superior à observação microscópica. Falsos negativos podem no entanto ocorrer em infecções recentes quando ainda não ocorreu produção de anticorpos detectáveis, em infecções crónicas, ou nos casos em que o animal não monta uma resposta humoral considerável (Gonen *et al.*, 2004). Falsos positivos surgem quando a infecção foi resolvida persistindo anticorpos no animal (Karagenc *et al.*, 2006). Em comum com os restantes hemoparasitas, as técnicas moleculares demonstram maior sensibilidade e especificidade na detecção do parasita, tanto em sangue periférico do hospedeiro como no vector artrópode (Li *et al.*, 2008).

### 3.4. Tratamento, profilaxia e saúde pública

Usualmente o tratamento recomendado baseia-se na administração de dipropionato de imidocarb quinzenalmente, até os gametócitos estarem ausentes em esfregaço sanguíneo. Todavia é possível que a eliminação completa do parasita não seja atingida. O prognóstico é geralmente favorável em cães com baixa parasitemia; nos casos em que o grau de parasitemia é elevado geralmente verifica-se co-infecção com outros agentes e o prognóstico fica condicionado pela resolução da doença associada (Baneth, 2011). A associação de doxiciclina com dipropionato de imidocarb é uma combinação terapêutica recomendada nos casos de co-infecção ou hepatozoonose refractária (Sarma, Mondal, Saravanan, Kumar, & Mahendran 2012).

O controlo da doença passa claramente pela restrição de exposição a carraças. Fêmeas devem ser tratadas convenientemente antes da reprodução de modo a evitar transmissão vertical.

Até hoje relata-se apenas um caso de infecção humana no arquipélago das Filipinas. Todavia, enquanto o espectro de hospedeiros para o *H. canis* não é totalmente clarificado, desconhece-se o potencial zoonótico deste parasita (Baneth, 2012)



#### 4. Erliquioses e Anaplasmoses

A erliquiose e anaplasrose caninas são causadas por Rickettsiae, um grupo de microorganismos  $\alpha$ -proteobacteria que parasitam células de artrópodes e vertebrados, frequentemente descrito como um intermediário evolutivo entre as bactérias e os vírus (Gosling, 2005). Na viragem do milénio, com base a análise filogenética, estes organismos sofreram uma extensa reestruturação taxonómica. Actualmente, os agentes etiológicos da anaplasrose e erliquiose caninas são classificados nos géneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*, da família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales (Dumler *et al.*, 2001). Esta ordem contém organismos que provocam distúrbios hematológicos, divididos entre as famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae. Anaplasmataceae são parasitas intracelulares que se desenvolvem em vacúolos citoplasmáticos, enquanto os *Rickettsiaceae* infectam o núcleo ou citoplasma da célula hospedeira, livres de vacúolo (Allison & Meinkoth, 2010).

Na Europa, as infecções em cães por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. têm sido identificadas em monócitos (*Ehrlichia canis*), granulócitos (*Anaplasma phagocytophilum*) e plaquetas (*Anaplasma platys*) (Solano-Gallego, Trotta, Razia, Furlanello & Caldin, 2006).

**Tabela 2** – Erliquioses e anaplasmoses caninas, espécies (as espécies em estudo a negrito), tropismo celular, vectores competentes e distribuição geográfica (Harrus, Waner & Neer, 2012)

CVBD	Espécie	Tropismo celular	Vector	Distribuição
Erliquiose Monocítica Canina	<b><i>E. canis</i></b>	Monócitos	<i>R. sanguineus</i>	Mundial (excepto Austrália)
		Macrófagos	<i>Dermacentor</i> spp. <i>Ixodes</i> spp.	
	<i>E. chaffeensis</i>	Monócitos	<i>Amblyomma</i> spp.	EUA
		Macrófagos Neutrófilos Linfócitos	<i>Ixodes</i> spp. <i>Haemophysalis</i> spp. <i>D. variabilis</i>	
	<i>E. ruminantium</i>		<i>Amblyoma hebraeum</i>	África subsaarina
Erliquiose Granulocitotrópica Canina	<i>E. ewingii</i>	Neutrófilos Eosinófilos	<i>Amblyomma americanum</i>	EUA
Anaplasrose Granulocitotrópica Canina	<b><i>A. phagocytophilum</i></b>	Neutrófilos Eosinófilos (raramente)	<i>Ixodes</i> spp.	Mundial (Hemisfério Norte)
Anaplasrose Trombocitotrópica Canina	<b><i>A. platys</i></b>	Plaquetas	Carraças, outros vectores hematófagos?	Mundial

## **4.1. Erliquiose Monocítica Canina: *Ehrlichia canis***

### **4.1.1. Ciclo de vida, etiologia e epidemiologia**

O género *Ehrlichia* é composto por bactérias intracelulares obrigatórias, que transmitidas por carraças, infectam leucócitos no hospedeiro vertebrado (Rymaszewska, & Grenda, 2008). A Erliquiose Monocitotrófica Canina (EMC) na Europa ocorre por infecção de *E. canis* a partir do vector *R. sanguineus*, no qual se verifica transmissão transtadial e por *co-feeding*. A prevalência da doença acompanha a distribuição geográfica da carraça, sendo endémica nas regiões mediterrânicas e balcânicas, com prevalências decrescentes nas regiões setentrionais (Bremer *et al.*, 2005). Existem contudo dados que suportam a transmissão deste agente por outros vectores, como a *Ixodes spp.* (Wielinga *et al.*, 2006), ou *Dermacentor spp.* (Johnson *et al.*, 1998), e ainda a transmissão via inoculação de sangue infectado (Allison & Meinkoth, 2010).

### **4.1.2. Patologia e quadro clínico**

Durante o período de incubação de 8-20 dias, os agentes multiplicam-se por fissão binária em monócitos, macrófagos e raramente linfócitos, formando mórulas vacuolizadas. O parasita é então disseminado via sistema fagocítico mononuclear, para órgãos como o fígado, baço e linfonodos, enquanto inibe a formação de plaquetas e promove a sua destruição. O período de incubação é seguido por três fases consecutivas características da doença: aguda, sub-clínica e crónica. Durante o período de 1-3 semanas da fase aguda, os sinais clínicos mais frequentes incluem letargia, anorexia, dispneia, febre, linfadenopatia, esplenomegália, petéquias, epistaxis e vômito. Os cães acometidos podem recuperar sem tratamento, contudo entram na subsequente fase sub-clínica em que são portadores inaparentes de infecção por um período que pode decorrer entre meses a vários anos (Harrus *et al.*, 2012). Posteriormente, existem evidências de que alguns animais recuperem totalmente sem demonstrarem mais sinais clínicos, embora a maioria progrida para a fase crónica. O mecanismo que desencadeia a doença crónica é ainda desconhecido; esta fase caracteriza-se por um quadro complexo e geralmente multissistémico, com envolvimento ocular, cardíaco e neuromuscular, agravado em situações de co-infecção com outras CVBD (ESCCAP, 2012).

### **4.1.3. Diagnóstico**

As alterações hematológicas mais comuns incluem trombocitopénia, geralmente severa na fase aguda, anemia não regenerativa, leucopenia e neutropénia. Após a fase aguda pode haver uma fase sub-clínica com trombocitopénia esporádica. Nos casos em que a infecção evolui para a cronicidade, geralmente ocorre pancitopénia (ESCCAP, 2012)

O diagnóstico morfológico, por observação microscópica em sangue periférico, é geralmente desaconselhado dada a parasitemia normalmente baixa e apenas visível na fase aguda (Rikihisa, 1991). As inclusões nos leucócitos surgem na forma de mórulas basofílicas mais

ou menos densas, de aparência granulada, contendo até 30-60 microorganismos, que normalmente não alteram a estrutura do leucócito (figura 3) (Popov *et al.*, 1998).

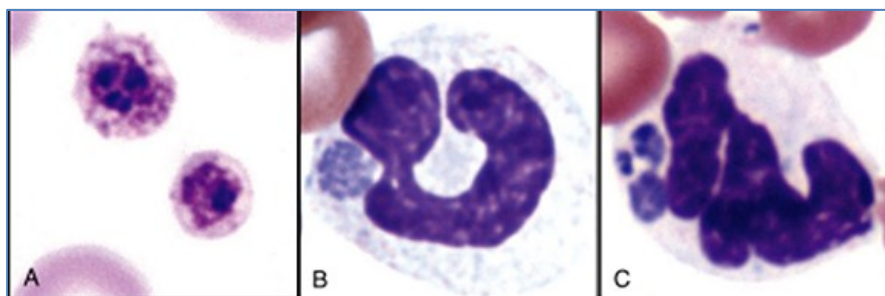
Os testes serológicos e os métodos moleculares evidenciam maior sensibilidade e são neste momento os mais usados na pesquisa de *E. canis*.

#### 4.1.4. Tratamento, profilaxia e saúde pública

A terapêutica recomendada pelo ESCCAP (2012) inclui a administração de doxiciclina na dose de 10mg/kg/dia durante 4 semanas, conjugada com terapia de suporte, baseada em glucocorticóides no início, perante trombocitopénia severa. A eficácia desta abordagem é no entanto variável caso a caso, e em algumas situações é possível que o período de administração se prolongue por mais de 6 semanas. Outros fármacos como a oxitetraciclina ou a minociclina estão descritos com semelhante eficácia (Harrus *et al.*, 2012).

O controlo passa necessariamente pela prevenção de infestação por ixodídeos. O potencial zoonótico de *E. canis* encontra-se sob investigação, após o relato de um caso de infecção humana na Venezuela (Harrus *et al.*, 2012)

**Figura 4** – Inclusões de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em esfregaço sanguíneo corado por Giemsa (1000x): **A:** mórulas de *A. platys* em plaquetas; **B:** mórula de *E. canis* em neutrófilo; **C:** mórulas de *A. phagocytophilum* em neutrófilo (Harvey, 2012b)



## 4.2. Anaplasmoses: *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum*

### 4.2.1. Ciclo de vida, etiologia e epidemiologia:

A Anaplasmoses Granulocítica Canina (AGC) e a Anaplasmoses Trombocitotrófica Canina (ATC), são doenças causadas por bactéria cocóides Gram negativas, respectivamente *Anaplasma phagocytophilum* infectante de neutrófilos e eosinófilos, e *Anaplasma platys* que infecta as plaquetas (Pluta, Hartelt, Oheme, Kimming & Mackenstedt, 2011).

*A. phagocytophilum* é capaz de infectar diversas espécies de mamíferos, desde animais domésticos e selvagens, até seres humanos. Ainda que a doença no cão aparente decorrer de infecções acidentais, estão descritas várias estirpes com diferentes virulências (Carrade, Foley, Borjesson & Sykes, 2009). O ciclo de vida deste agente inclui a rotação entre os granulócitos no hospedeiro canino, e o vector ixodídeo, que se infecta aquando da refeição sanguínea no cão e posteriormente o transmite a novo hospedeiro (Diniz & Breitschwerdt,

2012). *Ixodes ricinus* é o vector mais associado à transmissão da AGC na Europa (Rymaszewska & Grenda, 2008)

O ciclo epidemiológico de *A. platys* não está completamente descrito, contudo suspeita-se que *R. sanguineus* constitua um vector efectivo, não só porque o parasita é frequentemente detectado nesta carraça, como também pelos numerosos casos de co-infecção com agentes transmitidos por *R. sanguineus* (Dyachenko, Pantchev, Balzer, Meyersen & Straubinger, 2012). Outros ixodídeos têm demonstrado vestígios de ADN deste agente, contudo a transmissão natural ou experimental requer verificação (Harvey, 2012a). Em ambos os agentes a infecção directa entre hospedeiros por produtos de sangue contaminado é uma via de transmissão já amplamente demonstrada (Annen *et al.*, 2012).

#### **4.2.2. Patologia e quadro clínico**

As infecções por *A. platys* nos cães são na maioria assintomáticas, contudo estão descritos casos associados a doença grave na região mediterrânica (Aguirre, Tesouro, Ruiz, Amusatogui & Sainz, 2006). A trombocitopenia é o achado mais frequente e parece acompanhar a parasitemia num padrão cíclico. Isto é, inicialmente surge como consequência directa de alterações nas plaquetas pelo parasita em multiplicação, para então dar lugar a um período de silêncio clínico com alterações hematológicas leves ou ausentes, posteriormente agravadas por novos episódios de trombocitopenia aparentemente imuno-mediada, por vezes tão severa quanto o episódio inicial. Em termos gerais a infecção é acompanhada por sintomas inespecíficos como anorexia, depressão, linfadenopatia, mucosas pálidas e febre (Dyachenko *et al.*, 2012). A avaliação laboratorial evidencia normalmente trombocitopenia moderada e flutuante, mais severa no pico da parasitemia (Weiss & Tvedten, 2012).

No caso de *A. phagocytophilum* a doença manifesta-se após um período de incubação de 1-2 semanas, geralmente caracterizada por letargia, inapetência, febre e esplenomegalia; adicionalmente podem ocorrer anorexia, hepatomegalia e linfadenomegalia, bem como outros sinais inespecíficos associados ao sistema músculo-esquelético, respiratório, gastrointestinal e nervoso (Kohn, Galke, Beelitz & Pfister, 2008). As alterações laboratoriais são sobretudo evidentes durante a fase aguda da doença e incluem anemia não regenerativa moderada, trombocitopenia, linfopenia, neutropenia e eosinopenia (Weiss & Tvedten). Suspeita-se que mecanismo subjacente a estes distúrbios envolva processos de imunomodulação, associados à persistência do agente no hospedeiro, ainda que a infecção crónica não seja característica nos cães (Carradae *et al.*, 2009). Na verdade, apesar do vasto número de cães expostos ao agente em regiões endémicas, casos fatais por AGC não estão descritos em cães, e a doença parece exibir um carácter auto-limitante tanto no hospedeiro canino como no humano (Diniz & Breitschwerdt, 2012).

### 4.2.3. Diagnóstico

A identificação de mórulas em esfregaço de sangue periférico é o método mais expedito e acessível no diagnóstico destes agentes, porém difícil fora do período agudo da doença, sobretudo no caso de *A. phagocytophilum*, em que as inclusões nos neutrófilos geralmente não permanecem por mais que 28 dias (Diniz & Breitschwerdt, 2012). Por outro lado, dada a natureza cíclica da parasitemia, a detecção de *A. platys* pode ser um achado accidental num exame de esfregaço sanguíneo de rotina. Em coloração Giemsa surgem nas plaquetas inclusões basofílicas de pequenos organismos isolados ou em mórulas de maior dimensão, envoltos em vacúolos que podem ascender a 3 por plaqueta. O número de microorganismos por vacúolo parece variar entre 1-15 consoante o estágio de desenvolvimento do parasita (Chang *et al.*, 1996).

Os métodos serológicos como a IFI e o ELISA carecem de especificidade por não permitirem a distinção entre *A. platys* e *A. phagocytophilum* (Lappin, 2012). No caso de *A. phagocytophilum*, a detecção de anticorpos é possível 8 dias após a infecção, ou 2-5 dias após o aparecimento de mórulas, o que evidencia um hiato de tempo na fase aguda durante o qual os testes serológicos não têm valor de diagnóstico. Por outro lado os anticorpos podem persistir até um ano após a infecção (Carradae *et al.*, 2009).

Métodos imunocitoquímicos que envolvem a observação de esfregaços corados com soluções com anticorpos anti-*Anaplasma* contornam algumas das limitações da observação microscópica clássica, enquanto permitem o diagnóstico de infecção aguda anterior à seroconversão. Contudo, são procedimentos mais dispendiosos que o esfregaço sanguíneo e, como tal, pouco disseminados (Simpson & Gaunt, 1991).

A detecção genética por intermédio de PCR requer uma apropriada escolha de *primers* uma vez que alguns são apenas específicos para o género *Anaplasma*, não evidenciando distinção entre *A. platys* e *A. phagocytophilum*. O *nested* PCR é por agora o método mais específico na detecção destes agentes (Martin, Brown, Dunstan, Roberts, 2005).

### 4.2.4. Tratamento, profilaxia e saúde pública

A terapêutica recomendada pelo ESCCAP (2012) para a anaplasmose inclui a administração de doxiciclina na dose de 10mg/kg/dia durante 4 semanas e terapia de suporte sintomática. O controlo, tal como descrito para outros agentes transmitidos por vectores ixodídeos, passa pela prevenção da infestação por estes ectoparasitas.

*A. phagocytophilum* é um agente zoonótico apto a transmissão ao humano não só através da picada do vector, mas também através de sangue de outro hospedeiro contaminado (Little, 2010). Actualmente, não há registo de casos de infecção em humanos por *A. platys*.

## 5. Leishmaniose: *Leishmania infantum*

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários intra-celulares do género *Leishmania*, ordem Kinetoplastida da família Trypanosomatidae, parasitas que infectam numerosos mamíferos transmitidos pelas fêmeas de insectos voadores hematófagos, flebotomíneos da ordem Diptera, família Psycodidae e sub-família Phlebotominae (Gramiccia, 2011).

### 5.1. Ciclo de vida

No hospedeiro canino os parasitas do género *Leishmania* os promastigotas são fagocitados por células dendríticas e macrófagos da pele. Numa primeira fase também infectam os neutrófilos, onde não ocorre divisão; é nos macrófagos que se dividem e são observáveis na forma não flagelada, os amastigotas (Tomás & Romão, 2008). São pequenas células de forma oval arredondada com cerca de 2.5 a 5 µm de comprimento por 1.5 a 2 µm de largura, de núcleo basófilico azul arroxado em coloração Wright-Giemsa. Os amastigotas multiplicam-se por divisão binária e eventualmente provocam a ruptura do macrófago e infectam novas células. O parasita eventualmente progride da pele para os órgãos internos do hospedeiro, isolado no sistema vascular ou através da migração dos macrófagos que contêm o parasita. Posteriormente o flebótomo fêmea será infectado quando se alimenta no hospedeiro e é já no tracto digestivo anterior do vector que os amastigotas se diferenciam em formas flageladas designadas por promastigotas, que se replicam por divisão binária. O flebótomo vector será então colonizado pelo agente ao nível do aparelho bucal, inoculando-o no hospedeiro durante a próxima refeição sanguínea, onde as formas evoluirão para amastigotas sem flagelo, completando o ciclo infeccioso (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

### 5.2. Etiologia e epidemiologia

Actualmente são reconhecidas como infectantes do cão as seguintes espécies deste protozoário: *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis* e *L. amazonensis*. Destas, *L. infantum* é a espécie predominante na Europa, particularmente na região mediterrânica (Baneth & Solano-Gallego, 2012). Presente em 88 países, o sul da Europa permanece uma região endémica para este agente há várias décadas (Dujardin, *et al.*, 2008). Os vectores subdividem-se em dois géneros: *Phlebotomus* na Europa, África e Ásia; e *Lutzomyia* na América Central e América do Sul. Das cerca de 20 espécies de *Leishmania* com importância médica, a maioria é transmitida por apenas uma ou duas espécies de flebótomo, o que confere considerável especificidade à relação vector-parasita (Bates, 2008). Na Europa ocidental e nomeadamente em Portugal, as espécies mais relevantes do vector são o *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi* (Campino & Maia, 2010). Estes insectos, mais activos durante o período nocturno e crepuscular, estão

presentes durante todo o ano em climas tropicais e durante os meses mais quentes dos climas temperados como Portugal (Solano-Galego *et al.*, 2009).

A nível nacional, o Observatório Nacional das Leishmanioses estabelece actualmente as seguintes áreas endémicas: região de Trás-os-Montes e Alto Douro, sub-região da cova da Beira, concelho da Lousã, região de Lisboa e Setúbal, concelho de Évora e a região do Algarve. A prevalência nacional média é de cerca de 6% (Seixas, Alho, Guerra & Madeira de Carvalho, 2012). Na verdade, o cruzamento de dados de infecciosidade nas populações de regiões endémicas revela que a prevalência de infecção é consideravelmente superior à prevalência da doença (frequentemente abaixo dos 10% como no caso português). Parece consensual entre os investigadores que a maioria dos cães infectados não exhibe sinais clínicos ou alterações clinicopatológicas. Nesta concepção, a taxa de infecção entre a população canina pode ser bastante elevada com apenas alguns animais doentes – porventura aqueles que são incapazes de desenvolver uma resposta imunitária celular eficaz – enquanto outro grupo, bastante maior, permanece portador assintomático durante um longo período até que uma dada circunstância activa a infecção latente e induz o desenvolvimento de sinais clínicos. Todos os animais portadores, sintomáticos ou assintomáticos, são potencialmente infectantes para os flebotomíneos (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008a).

A prevalência e a incidência da doença são altamente dependentes das condições ecológicas e climáticas, tanto que, inclusivamente nas zonas endémicas a distribuição da doença é focal e não uniforme no território (Bourdeau, 2009; Mencke, 2011). A seroprevalência praticamente acompanha a distribuição das populações de vectores, cuja actividade é manifestamente influenciada pela temperatura e humidade ambiente (Campino, 2002). Neste contexto, regiões até agora indemnes têm reportado novos casos de leishmaniose canina associadas à presença de vectores na área (Dereure *et al.*, 2009).

Até na ausência de vectores competentes ou de história de migração, a incidência de infecções por leishmania em áreas indemnes outorga novas perspectivas à via de transmissão da doença no hospedeiro canino. Três alternativas à via clássica vector-hospedeiro estão actualmente documentadas: a transmissão venérea unidireccional de macho para fêmea (Silva *et al.*, 2009), a transmissão vertical transplacentária da fêmea para o cachorro (Boggiato *et al.*, 2011) e a infecção por produtos de sangue contaminado. Esta última via, experimental e naturalmente comprovada, força um alerta sobre os dadores de sangue (Tabar, Roura, Francino, Altet, & Ruiz de Gopegui, 2008). A transmissão directa de cão para cão, por exemplo através de interacção agressiva, é uma hipótese estudada ainda sem confirmação (Duprey *et al.*, 2006). O papel de outros artrópodes na transmissão de leishmaniose ao hospedeiro canino tem sido igualmente aferido. Embora ainda sem resultados que comprovem inequivocamente a transmissão natural do parasita ao cão, alguns estudos sugerem que a pulga *Ctenocephalides felis* (Coutinho & Linardi, 2007) e a

carraça *R. sanguineus* (Coutinho *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2012) possam constituir vectores na leishmaniose canina. Até que surjam pesquisas mais esclarecedoras, assume-se que a transmissão da doença sem intervenção dos flebotómíneos desempenhe apenas um papel marginal na epidemiologia da doença na Europa (Baneth *et al.*, 2008).

Embora não haja consenso quanto à predisposição de raças, detecta-se maior número de casos em raças normalmente usadas para guarda; estes animais estão sujeitos aquele que é um dos factores de risco mais relevante, a permanência no exterior, especialmente ao anoitecer e amanhecer, períodos que evidenciam maior actividade do flebótomo (Campino, 2002). A idade também parece ser um factor relevante com picos de prevalência de doença em cães jovens e idosos. Pensa-se que animais mais sensíveis à infecção desenvolverão doença numa idade jovem, enquanto o maior número de casos em cães idosos pode reflectir o maior tempo de exposição ao vector ou o declínio do sistema imunitário (Miranda, Roura, Picado, Ferrer & Ramis, 2008). No que concerne às diferenças entre sexos, os estudos disponíveis não fornecem para já consenso quanto a este factor (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

*L. infantum* tem sido descrita numa grande variedade de carnívoros selvagens, roedores e equinos. O gato é desde há vários anos reconhecido como um hospedeiro reservatório assintomático do parasita nas zonas endémicas. O potencial epidemiológico destes hospedeiros permanece obscuro (Maia, Nunes & Campino, 2008).

### **5.3. Patologia e quadro clínico**

Em termos evolutivos, o quadro clínico grave com elevada morbilidade e mortalidade, sugere que o cão é um hospedeiro recente para este parasita, contudo, os casos sintomáticos são manifestamente inferiores ao número de infecções assintomáticas (Solano-Gallego, Morell, Arboix, Alberola & Ferrer, 2001).

Após infecção, o período de incubação do agente no hospedeiro canino pode variar entre 3 meses até 7 anos, pelo que a progressão do quadro clínico da doença é geralmente um processo longo e em parte imprevisível, aparentemente influenciado pelo tipo de resposta imune que o hospedeiro desenvolve. Nos casos em que o animal desenvolve uma resposta com predomínio de linfócitos B, a imunidade protectora contra o parasita é mediada por resposta celular que induz nos macrófagos actividade anti-leishmania. Os cães que conseguem eliminar o parasita, ou restringir a infecção, mantêm-se assintomáticos por longos períodos e são considerados clinicamente resistentes. Episódios imunossupressivos ou doença concomitante podem conduzir à manifestação da doença nestes animais (Baneth *et al.*, 2008). Nos casos em que há uma resposta marcadamente humoral, há produção de grandes quantidades de imunoglobulinas não protectoras, que ao ligar-se aos antígenos formam imunocomplexos prejudiciais. O parasita eventualmente invade outras células, origina uma resposta inflamatória granulomatosa nos tecidos, promove a formação de mais imunocomplexos e a produção de anticorpos anti-nucleares (Baneth *et al.*, 2008). A



susceptibilidade destes animais parece ter uma base genética que assenta na incapacidade de impedir a disseminação e multiplicação de amastigotas pelo organismo, o que compõe o mecanismo fisiopatológico chave na doença (Solano-Gallego, 2009).

A leishmaniose é crónica e pode afectar qualquer órgão ou tecido no hospedeiro canino; como consequência dos numerosos mecanismos patogénicos, a expressão clínica é variadíssima e na maior parte dos casos inespecífica (Baneth & Solano-Gallego, 2012). Os achados de anamnese e exame físico mais comuns encontram-se listados na tabela 3.

**Tabela 3** – Achados de anamnese e exame físico mais comuns na leishmaniose canina (Baneth & Solano-Gallego, 2012)

<b>Anamnese</b>	<b>%</b>	<b>Exame físico</b>	<b>%</b>
Perda de peso	64	Lesões cutâneas	81-89
Sonolência	60	Caquécia	10-48
Polidipsia	40	Dificuldade de locomoção	37,5
Anorexia	32,5	Hipertermia	4-36
Diarreia	30	Doença ocular	16-81
Vómito	26	Esplenomegália	10-53
Polifagia	15	Onicogribose	20-31
Epistaxis	6-15	Rinite	10
Melena	12,5	Pneumonia	2,5
Espirros	10	Icterícia	2,5

Animais com doença grave apresentam normalmente caquécia, atrofia muscular, linfadenomegália generalizada, esplenomegália. Outras complicações a nível hepático, digestivo, ocular, articular/ósseo, e sobretudo renal, podem surgir devido à deposição de imunocomplexos. A insuficiência renal é um dos principais motivos de casos fatais nesta doença (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

O quadro clínico pode também agravar-se quando condições secundárias como demodecose, pioderma e pneumonia se desenvolvem. Igualmente, infecção concomitante por *Ehrlichia*, *Hepatozoon*, *Babesia*, *Trypanosoma*, *Bartonella* ou *Dirofilaria* podem exacerbar os sinais clínicos e as alterações clinicopatológicas (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

#### **5.4. Diagnóstico**

Em regiões endémicas, normalmente o diagnóstico da doença sucede-se à suspeita suscitada pela história pregressa e sinais clínicos do animal. Leishmaniose canina deve ser equacionada sempre que ocorre azotémia ou proteinúria de origem renal, anemia normocítica e normocrómica não regenerativa, hiperproteinémia com hiperglobulinémia associada a hipoalbuminémia (rácio albumina/globulinas diminuído) e aumento das enzimas

hepáticas séricas (ALT, AST e FAS). Distúrbios de coagulação, como trombocitopénia ou fibrinólise, são também achados comuns. Dados os diversos mecanismos patológicos da doença, exames complementares de diagnóstico como a imagiologia devem ser empregues consoante o quadro clínico (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A complexidade do diagnóstico desta doença levou ao desenvolvimento de numerosas técnicas direccionadas para a demonstração do agente no hospedeiro. Os métodos mais comuns incluem: a observação do agente em tecidos por citologia, histopatologia ou cultura; testes serológicos que demonstram exposição ao parasita por detecção de anticorpos; e testes moleculares que fornecem evidência de ADN parasitário no hospedeiro (Gomes, Cavalcanti, Lira, Abath & Alves, 2008).

O isolamento do parasita por cultura é geralmente usado no âmbito da investigação de modelos de infecção experimental, na detecção de infecções patentes, ou para posterior caracterização dos isolados. Trata-se de uma técnica 100% específica mas pouco disseminada devido a morosidade do processo e elevado risco de contaminação (Maia & Campino, 2008). A citologia e histopatologia permitem a observação dos amastigotas em amostras recolhidas de tecidos infectados, como a medula óssea, os linfonodos, pele, baço ou fígado (Oliva *et al.*, 2006). O esfregaço citológico é observado em microscópio óptico e constitui um exame razoavelmente específico, acessível e aplicável na maioria dos contextos. A histopatologia permite recolher informação adicional sobre os tecidos observados, contribuindo desta forma para a compreensão do processo patológico em curso. Estas análises são invasivas e podem ser morosas, exigindo do operador experiência laboratorial na detecção do agente que nem sempre surge em quantidade, mesmo em animais com doença exuberante, já que por norma não existe associação entre a gravidade da doença e a carga parasitária (Bourdeau, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Existe no entanto, correspondência entre a gravidade da doença e os níveis de anticorpos anti-leishmania circulantes. Os testes serológicos quantitativos, dos quais os mais comuns são a IFI, o ELISA e o Teste de Aglutinação Directa ou *Direct Agglutination Test* (DAT), têm assim real utilidade preditiva na evolução e prognóstico da leishmaniose canina (Ferreira *et al.*, 2007a). Genericamente, níveis elevados de anticorpos estão associados a grande carga parasitária. Desta forma, em cães com sinais clínicos, ou alterações histopatológicas, compatíveis com a doença, a detecção de títulos elevados de anticorpos constitui diagnóstico definitivo (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Na maioria dos países da bacia mediterrânica, a IFI é considerado o *gold standard* no diagnóstico serológico de infecção por *L. infantum*, geralmente evidenciando bons resultados de sensibilidade e especificidade. A técnica baseia-se na detecção de anticorpos no soro de cães infectados, evidente pela fluorescência observada ao microscópio de imunofluorescência, em placas com antigénio de promastigotas. Dependendo do laboratório utilizam-se diferentes titulações como limiar de positividade. Embora este teste seja

especialmente sensível na detecção de infecções sintomáticas, em animais assintomáticos a sua sensibilidade é bastante variável (Oliva *et al.*, 2006). O ELISA pode fornecer uma vantagem adicional nestes casos, contudo as diferentes opções de testagem serológica variam consideravelmente nos antigénios usados ou nos limiares de positividade aplicados (Mettler, Grimm, Capelli, Camp & Deplazes, 2005). Esta falta de *standardização* entre técnicas dificulta a sua comparação e salienta a necessidade de adaptar o método a usar caso a caso (Figueiredo *et al.*, 2010). O diagnóstico serológico qualitativo, como o método por imunocromatografia sob a forma de *kit* rápido, permite um resultado célere contudo de sensibilidade variável e que por norma requer avaliação posterior com métodos quantitativos.

Técnicas moleculares permitem amplificar e detectar quantidades mínimas de ADN parasitário com sensibilidade e especificidade próximas de 100%. Existem contudo situações em que falsos negativos podem ocorrer, e como tal um resultado negativo no PCR não é sinónimo de ausência de infecção (Maia & Campino, 2008). O teste pode ser aplicado a vários tecidos, com melhores sensibilidade na medula óssea, linfonodos, baço e pele, (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

### **5.5. Tratamento, profilaxia e saúde pública**

O tratamento é complexo e muitas vezes sem resultados satisfatórios. A terapêutica é geralmente onerosa, de longa duração e muitas vezes com resultados pouco satisfatórios. Muitos animais permanecem portadores do parasita, com capacidade de transmissão ao vector e as recidivas são frequentes (Meireles, 2008). Várias abordagens, com diferentes fármacos, posologias e duração de tratamento, estão disponíveis. Os fármacos mais indicados incluem o antimoniato de N-metil glucamina (1<sup>a</sup> linha) e a miltefosina (2<sup>a</sup> linha), cada um acompanhado pelo alopurinol. A anfotericina B como tratamento de 3<sup>a</sup> linha deve ter em conta o risco de nefrotoxicidade. A maioria dos animais demonstra melhorias no primeiro mês após a instituição da terapêutica, sendo que a existência de insuficiência renal piora o prognóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Actualmente existem também no mercado português estimulantes imunitários como o Leishguard®.

Está actualmente disponível em Portugal uma vacina que possibilita reduzir o risco de infecção activa e de doença clínica. Só deve ser administrada em cães serologicamente negativos para *Leishmania*, a partir dos seis meses de idade, em três doses com três semanas de intervalo e, posterior reforço anual. Dada a recente introdução desta vacina o impacto na epidemiologia da doença em Portugal permanece desconhecido.

Já bem documentados, estão os esforços centrados na eliminação de animais infectados e dos vectores, que têm revelado resultados tão controversos quanto insatisfatórios (Baneth & Sollano-Gallego, 2012). No entanto, a profilaxia deve passar sobretudo por impedir o máximo possível de expor o cão ao vector, quer através de barreiras físicas (evitando o exterior, uso de redes mosquiteiras, electrocutores), quer de barreiras químicas (insecticidas

ou repelentes) ou até através de meios naturais como a plantação de buganvílias (*Bugainvillea glabra*), limonete (*Loysia triphila*) e de ricino (*Ricinus communis*) (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008). A combinação de permetrina 50% com imidaclopride a 10% (Advantix®) é uma formulação em *spot-on* com duração de pelo menos 21 dias, que demonstra bons resultados, tanto na acção repelente, como na morte dos flebótomos que entram em contacto com os animais tratados (Otranto *et al.*, 2007). As coleiras impregnadas com deltametrina demonstram igualmente bons resultados na prevenção da doença em áreas endémicas, com a vantagem de serem eficazes durante 6 meses (Miró *et al.*, 2008). Num estudo com cães militares, Roqueplo (2003) concluiu que o uso destas coleiras não prejudica a *performance* olfactiva destes animais, enquanto promove uma redução da prevalência da doença nos efectivos. O controlo da doença canina passa necessariamente também pelo controlo dos animais errantes e na aferição do real papel epidemiológico de outros hospedeiros reservatórios (Meireles, 2008).

A leishmaniose humana compreende 4 entidades epidemiológicas distintas: a leishmaniose visceral zoonótica/antropozoonótica e leishmaniose cutânea zoonótica/antropozoonótica. Nas formas antropozoonóticas, o ser humano é a única fonte de infecção para o flebótomo vector, ao passo que na forma zoonótica o parasita é mantido no ambiente e disseminado por hospedeiros reservatórios, como o cão (Desjeux, 2001). A relação directa entre a prevalência de leishmaniose canina e de leishmaniose humana não é todavia evidente; a infecção no cão apresenta valores de incidência/prevalência muito superiores e abrange uma área mais vasta quando comparada com a infecção humana (Campino & Maia, 2010). Com 1-1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea humana e outros 500 mil de leishmaniose visceral, estimam-se 12 milhões de humanos infectados anualmente e 350 milhões de indivíduos em risco (Desjeux, 2001). A tendência de expansão da Leishmaniose canina equivale aos crescentes casos de leishmaniose zoonótica no continente Europeu. Estudos recentes reportam infecção autóctone em humanos em países do norte europeu como a Alemanha ou a Noruega (Bogdan *et al.*, 2001; Blonski, Blödorn-Schlicht, Falk, Faye & Clausen, 2012). O crescente número de casos de leishmaniose canina e leishmaniose humana na Europa, podem partilhar fundamentos comuns nas alterações decorrentes da actividade humana, mas no caso da leishmaniose zoonótica, outros factores são apontados para esta expansão como a resistência a determinadas drogas usadas nos casos zoonóticos, ou transmissão entre indivíduos toxicodependentes por meio de seringas partilhadas e imunodeprimidos como no caso de infecções por HIV (Croft, Sundar & Fairlamb, 2006; Desjeux & Alvar, 2003). Adicionalmente, os investigadores lançam o alerta da possibilidade de importação de outras espécies do parasita para o velho continente, nomeadamente *L. donovani* e *L. tropica*, agentes que poderão encontrar um vector competente no território e contribuir para os casos de doença humana (Dujardin, *et al.*, 2008).

## **6. Dirofilariose: *Dirofilaria immitis***

A dirofilariose canina é uma doença causada por nemátodes filarídeos pertencentes à superfamília Filarioidea. Várias espécies parasitas infectam carnívoros domésticos e selvagens a nível mundial e todas elas são transmitidas por insectos hematófagos. É neste vector que embriões vermiformes, designados de microfílarias, se desenvolvem em estádios infectantes que serão inoculados no hospedeiro na próxima refeição do insecto (Bowman, 2009). O género de maior relevância clínica é *Dirofilaria*, cuja espécie mais pertinente em Portugal é *Dirofilaria immitis*, um parasita que se aloja na artéria pulmonar dos cães, o seu hospedeiro natural (Seixas *et al.*, 2012).

### **6.1. Ciclo de vida**

Na infecção por *D. immitis* os adultos situam-se principalmente nas artérias pulmonares, podendo atingir o ventrículo direito e veia cava do hospedeiro no caso de infecção maciça. A reprodução dos adultos origina larvas L1 (microfílarias) que circulam na corrente sanguínea até serem ingeridas pelo mosquito hematófago fêmea (Hoch & Strickland, 2008). Durante um período de 7-18 dias, as microfílarias sofrem um processo de maturação no mosquito, mudando para L2 e posteriormente para L3, o estágio infectante. Ao migrar para a parte bucal do insecto, as L3 – que por esta altura já evidenciam dimorfismo sexual – serão transmitidas ao hospedeiro definitivo enquanto o insecto se alimenta. Três dias após a infecção a maioria das larvas são encontradas no tecido subcutâneo nas proximidades do local de inoculação. Por volta do dia 21 terão migrado para o abdómen, ao dia 41 já se encontram no tórax, e podem atingir o coração aos 70 dias (McCall *et al.*, 2008). Durante um período de 2-3 meses as L3 percorrem os tecidos subcutâneos, adiposos e músculo-esqueléticos, onde sofrem duas mudas, para L4 e seguinte L5 (adulto imaturo). Este estágio penetra no coração onde após 3-4 meses ocorre a maturação final para adulto (machos com 15-18cm e fêmeas de 25-30cm) (Foster & Walker, 2009). Após reprodução, a fêmea adulta liberta microfílarias na circulação e a infecção torna-se patente e detectável. Quando comparado com a maioria dos parasitas nemátodes, o ciclo de vida de *D. immitis* é relativamente longo, podendo completar-se tão cedo quanto os 6 meses, porém dura tipicamente entre 7 a 9 meses (McCall, Genchi, Kramer, Guerrero & Venco, 2008).

### **6.2. Etiologia e Epidemiologia**

Infecção crónica, porventura fatal nos cães, a doença inclui na sua epidemiologia um nemátode filarídeo *D. immitis*, mosquitos vectores e cães domésticos e silvestres como hospedeiros definitivos. O parasita pode infectar mais de 30 outras espécies de mamíferos, desde o gato doméstico a humanos, estando inclusivamente descrito o primeiro caso numa ave (Sano *et al.*, 2005). A baixa especificidade do parasita amplia o número de hospedeiros reservatórios e contribui decisivamente para a expansão da doença (Nelson, 2012). O gato doméstico por exemplo pode servir de fonte de infecção para os mosquitos, e ainda que

associada a baixas prevalências, a dirofilariose felina suscita já atenção em Portugal (Rosa, 2009; Almeida, 2010; Ramos, 2012).

Aproximadamente 70 espécies de mosquitos culicídeos são potenciais vectores de dirofilariose animal e humana a nível mundial, sendo os géneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* os mais relevantes na dirofilariose canina na Europa (Morchón, Carretón, González-Miguel & Mellado-Hernández, 2012). A doença ocorre sobretudo nas zonas do sul europeu (com elevada prevalência na Península Ibérica), onde as condições climáticas favorecem a dinâmica epidemiológica do parasita e vectores (Genchi, Rinaldi, Cascone, Mortarino & Cringoli, 2005a). Com efeito, as condições de temperatura e humidade são simultaneamente essenciais à manutenção de populações de mosquitos vectores e à maturação das microfilárias no vector (Atkins, 2010). Foi demonstrado que este processo depende de uma temperatura mínima constante de 14°C, sendo que a temperaturas constantes de 30° C, a maturação (em algumas espécies de vector), ocorre em apenas uma semana (Fortin & Slocombe, 1981). Com a determinante do clima, a dirofilariose canina pode apresentar uma ocorrência sazonal e, em Portugal, o período mais favorável à ocorrência situa-se entre os meses de Junho e Outubro (Genchi *et al.*, 2005a). Além da transmissão vectorial, especula-se sobre a viabilidade de transmissão vertical pela via transplacentária, embora tenha sido demonstrado que as microfilárias não atingem a maturação por esta via; porém, nestas condições mantêm-se infectantes para os mosquitos, contribuindo para a manutenção do ciclo epidemiológico (Kittleson & Kienle, 1998).

Animais que passam mais de 50% do seu tempo no exterior apresentam maior risco de infecção, pelo que a susceptibilidade do hospedeiro canino parece variar consoante o maior ou menor grau de exposição ao vector artrópode (Miller & Crosbie, 2011). Desta forma, torna-se relevante aferir a função que o animal ocupa no seu contexto; cães de caça, cães pastores e cães de guarda, permanecem mais tempo expostos ao vector e, de forma concordante, têm revelado maior prevalência de infecção (Montoya, Morales, Ferrer, Molina & Corbera, 1998). Alguns autores registam também mais casos em cães machos, provavelmente pelo uso frequente destes cães com a função de guarda (Yildirimetal., 2007). Porém, na Coreia do Sul um estudo com 848 cães não encontrou evidência estatística de maior prevalência nos machos, tendo identificado outro factor de risco, a localização perto de massas de água, *habitats* propícios ao desenvolvimento do vector (Song *et al.*, 2003).

Consensual parece ser o facto de cães jovens (idade inferior a 1 ano) apresentarem menor prevalência de infecção. Este facto explica-se pelo maior tempo de exposição ao vector nos animais mais velhos, conjugado com o longo período pré-patente de 7-9 meses, que limita o espaço temporal para um animal jovem se infectar (Song *et al.*, 2003; Duran-Struuck, Jost & Hernandez, 2005). O período pré-patente corresponde ao intervalo de tempo que decorre desde a transmissão/inoculação de estádios infectantes até ser possível a detecção do agente (microfilárias) no hospedeiro (Mehlhorn, 2008). Em boa verdade, alguns animais

infectados por parasitas adultos, podem não apresentar microfilárias em circulação (Foster & Walker, 2009). Esta condição, denominada de infecção oculta, é sobretudo característica de regiões endémicas e aparentemente pode surgir em quatro cenários: infecção pré-patente (até aos seis meses pós infecção), infecção unissexual, esterilidade dos adultos, ou finalmente nos casos em que a resposta imune do hospedeiro conduz à eliminação das microfilárias (Pantchev, Etzold, Dauschies & Dyachenko, 2011).

### 6.3. Patologia e quadro clínico

A doença no cão não é só consequência da sobrecarga cardiovascular provocada pela permanência dos nemátodes no coração, decorre também das alterações no endotélio das artérias pulmonares, distúrbios que diminuem o débito cardíaco para os pulmões, resultando em sinais de comprometimento do coração direito e porventura insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Eldridge & Edman, 2003).

A patologia pulmonar pode começar tão cedo quanto os 7 meses pós-infecção, altura em que os adultos imaturos já ocupam as artérias pulmonares. Dilatação arterial, tortuosidade e obstrução de vasos de menor calibre, são sobretudo evidentes nos lobos pulmonares caudal e intermédio, onde o fluxo sanguíneo é maior. À obstrução do fluxo sanguíneo seguem-se infiltrados alveolares e intersticiais e inflamação granulomatosa nos pulmões. Esta condição induz febre, tosse, dispneia, hemoptise, leucocitose e trombocitopénia, sinais que são mais evidentes em cães pequenos ou com maior actividade física (Clavert & Thomasson, 2008). Por esta altura podem ser detectadas alterações na auscultação cárdio-pulmonar, com “crackles” ao nível do lobo pulmonar caudal e auscultação cardíaca *split* de S2 ou seja, a divisão do segundo som cardíaco coincidente com o fim da sístole (McCall *et al.*, 2008). Mais tarde, o desenvolvimento de ICC é notado com a presença de derrames cavitários, anorexia, perda de peso e desidratação. Nesta fase, murmúrios cardíacos no lado direito do tórax, devido a insuficiência da tricúspide e fibrilhação atrial, são achados comuns (McCall *et al.*, 2008). A forma mais severa da doença ocorre quando fragmentos de nemátodes já mortos obstruem as arteríolas e provocam hipertensão pulmonar, consequente hipertrofia ventricular direita e porventura insuficiência cardíaca congestiva (Bowman, 2009).

Os factores primordiais no despoletar de sinais clínicos incluem, a carga parasitária em função do tamanho do cão, a duração de infecção, e a resposta individual do hospedeiro à infecção (Clavert & Thomasson, 2008). O número de microfilárias no sangue periférico não corresponde ao número total de filárias adultas presentes no organismo, não sendo possível usar esta característica como critério para determinar a gravidade da infecção (Atkins, 2010). Essencialmente em função da carga parasitária foi criado um sistema de 4 estádios de doença no cão no sentido de enquadrar o tratamento e o prognóstico da doença. Assim, a classe 1 indica infecção subclínica; a classe 2 evidencia sintomatologia moderada com tosse, dispneia e reduzida tolerância ao exercício; classe 3 agrava estes sinais e inclui possibilidade de síncope, hemoptise, ICC e ascite; e a classe 4 corresponde aos casos em

que já é evidente síndrome de veia cava. Neste último nível, o prognóstico a curto prazo é muito reservado e perfila a cirurgia para remoção dos parasitas (Bowman & Atkins, 2009).

#### **6.4. Diagnóstico**

Alterações laboratoriais não são normalmente conclusivas para o diagnóstico da dirofilariose canina. Podem surgir alterações ao hemograma como eosinofilia, basofilia, neutrofilia, anemia não regenerativa e trombocitopenia. A nível bioquímico as alterações mais comuns traduzem-se na elevação das enzimas hepáticas, azotemia e hiperbilirrubinemia (Nelson, 2012).

As técnicas imagiológicas como a radiografia torácica, a ecocardiografia e a electrocardiografia, significam um valioso contributo para a avaliação da gravidade da doença cardíaco-pulmonar. Anteriormente à disponibilidade de testes serológicos, a radiografia constituía um método válido na detecção de doença oculta, uma vez que os sinais clínicos precoces visualizáveis ao raio x estão presentes em 85% dos casos (Atkins, 2010). Nos estados avançados o coração surge em forma de D invertido (por dilatação e forma arredondada da margem direita e deslocamento do ápice cardíaco) e nos pulmões ocorrem alterações nas artérias do lobo caudal que surgem aumentadas, tortuosas e muitas vezes truncadas (Losonsky, Thrall & Lewis, 1983). As medidas de dimensão cardíaca total, da veia cava, e das artérias pulmonares, podem ser úteis no estadiamento da doença e avaliação da eficácia do tratamento adulticida (Litster Atkins, Atwell & Buchanan, 2005). A ecocardiografia pode revelar linhas hiperecogénicas compatíveis com a presença dos nemátodes nas artérias pulmonares ou nas cavidades cardíacas. Contudo a sensibilidade está altamente dependente do operador e da carga parasitária (Atkins *et al.*, 2008). O exame electrocardiográfico tem porventura menor valor de diagnóstico que os restantes, porém, é útil na detecção de arritmias ou de desvio do eixo cardíaco (Hoch & Strickland, 2008).

O diagnóstico parasitológico tem a sua forma mais simples na detecção de microfilárias em sangue periférico, recorrendo ao exame directo de uma gota de sangue total ao microscópio óptico (“gota a fresco”), onde as microfilárias são observadas em movimento entre os elementos sanguíneos. Em alternativa, pode-se recolher a zona inferior à camada flogística num tubo de hematócrito e proceder de forma semelhante, com vantagem adicional em termos de sensibilidade (Ware, 2009).

Esta observação directa, rápida e acessível, revela menor sensibilidade quando a microfilarémia é reduzida e carece de especificidade; para este propósito, técnicas de concentração como o teste de Knott, ou o teste de filtração em membrana de polycarbonato, constituem os métodos mais recomendados (Zajac & Conboy, 2012). Estes procedimentos providenciam a individualização das larvas face aos elementos sanguíneos, garantindo maior sensibilidade e possibilitando a distinção ao nível da espécie (Ferasin & Knight, 2005). Na Europa, outras espécies de nemátodos filarídeos além de *D. immitis* infectam cães e



podem ter microfilárias em circulação, como *Dirofilaria repens* e *Acanthocheilonema (Dipetalonema) reconditum*, tornando-se imperativa a sua diferenciação (Genchi *et al.*, 2005a). Existem outras técnicas de concentração de microfilárias, porém o Knott tornou-se o método padrão, recomendado pela qualidade dos resultados face ao baixo custo (Ferasin & Knight, 2005; Bowman, 2009; American Heartworm Society, 2012; Zajac & Conboy, 2012). Na base da diferenciação entre as espécies estão características morfológicas evidentes à observação microscópica, adiante descritas no capítulo “Material e Métodos”. Outro método que permite a distinção destas espécies baseia-se em corantes histoquímicos, em que padrões de manchas ácido-fosfatase positivas vermelhas evidenciam diferenças morfológicas entre as espécies de microfilárias (Schrey & Trautvetter, 1998).

Na dirofilariose canina, alguns autores alertam para a testagem apenas por identificação de microfilárias, não só devido à menor sensibilidade quando comparado com as alternativas de detecção de antígenos, como também porque uma percentagem considerável de animais pode ter infecção oculta (American Heartworm Society, 2012; Otranto, Dantas-Torres & Breitschwerdt, 2009a). Em sentido inverso, a infecção patente sem antígeno detectável pode também ocorrer, pese embora esteja descrita como uma situação menos frequente (Courtney & Zeng, 2001a; Pantchev *et al.*, 2011).

A identificação de antígenos circulantes produzidos pelas fêmeas adultas do parasita é actualmente método de eleição no diagnóstico de dirofilariose canina (Genchi, Venco & Genchi, 2007). O ELISA, a imunocromatografia e a hemaglutinação, são as principais técnicas que detectam, em sangue, soro ou plasma, proteínas específicas produzidas pelo sistema reprodutor das filárias adultas. A maioria das infecções ocultas pode ser detectada mas falsos negativos ocorrem em infecções pré-patentes ou naquelas em que a carga parasitária é reduzida ou constituída apenas por adultos do mesmo sexo (Atkins, 2003). O teste deve ser assim suplementado pela pesquisa de microfilárias por observação microscópica ou técnicas de concentração, e nunca considerado em animais com idade inferior a 7 meses (Vezzani, Fontanarrosa, & Eiras, 2008). Os testes de pesquisa de antígeno são ainda úteis no acompanhamento da terapêutica, já que a concentração de antígenos decresce até limites indetectáveis 3 a 5 meses depois do início do tratamento (Ferasin & Knight, 2005). Ao contrário da microfilarémia, a quantidade de antígenos presentes em circulação é proporcional à carga de vermes adultos fêmeas no hospedeiro. Contudo este dado só pode ser aferido através do ELISA, limitado pelo aumento transitório de antigenemia relacionado com a morte recente de adultos ou, quando as fêmeas são imaturas (Genchi *et al.*, 2007).

A expansão de agentes filarídeos a novos territórios ou a re-emergência em zonas endémicas tende a dificultar a diferenciação morfológica e/ou antigénica de microfilárias (Casiraghi *et al.*, 2006). Nestes casos o PCR providencia um diagnóstico altamente sensível e capaz de distinguir até 6 filarídeos numa só reacção (Rishniw *et al.*, 2006), contudo

partilha das limitações dos métodos moleculares já descritos, como o custo e necessidade de laboratórios especializados. Independentemente da técnica e dos resultados, o diagnóstico de dirofilariose canina deve considerar o ciclo de vida do parasita e o contexto epidemiológico do hospedeiro (Shearer, 2011).

### **6.5. Tratamento, profilaxia e saúde pública**

O tratamento para a dirofilariose é complexo e exige não só a compreensão da epidemiologia da doença, no que respeita à transmissão e período pré-patente, como a susceptibilidade aos fármacos dos diferentes estádios de desenvolvimento (American Heartworm Society, 2012). Todos os cães com dirofilariose devem ser presumíveis hospedeiros de adultos, larvas L3 e L4 e juvenis. O objectivo terapêutico deve pretender melhorar a condição clínica do animal e eliminação de todos os adultos e estágios de desenvolvimento do parasita com o mínimo de complicações associadas (Nelson, 2012).

Dihidroclorato de melarsomina (DM) é o composto mais recomendado no tratamento adulticida. O protocolo depende da classificação da doença, segundo a evolução clínica e a concentração de antígenos (Kittleson & Kienle, 1998). O protocolo *standard* consiste em 2 injeções de DM separadas por 24h, em cães com baixo risco de complicações como o tromboemolismo. Nos casos de elevado risco pretende-se eliminar os nematodes em duas fases. É administrada uma dose inicial, seguida do protocolo *standard* de duas doses 4 a 6 semanas depois (AHS, 2005; Ware, 2007). Se o tratamento tiver sucesso, a morte dos adultos implica inevitáveis complicações como o tromboembolismo pulmonar, pelo que se recomenda tratamento de suporte com base em corticoesteróides, heparina e restrição de exercício (ESCCAP, 2012).

Lactonas macrocíclicas (ivermectina, milbemicina oxima, selamectina, moxidectina) são altamente eficientes contra microfilárias em estádios larvares L3 e L4, e possuem efeito adulticida quando administrados continuamente por período superior a 24 meses (American Heartworm Society, 2012). Adicionalmente, a *D. immitis* alberga bactérias intracelulares do género *Wolbachia* que aparentemente desempenham um papel essencial na função biológica dos seus hospedeiros filarídeos. A administração de doxiciclina reduz o número de *Wolbachia* presente em todos os estádios de desenvolvimento da *D. immitis*, contribuindo para a progressiva redução da microfilarémia (American Heartworm Society, 2012).

A prevenção passa sobretudo pela administração de lactonas macrocíclicas que impedem o desenvolvimento dos estádios larvares no hospedeiro. Quando aplicada correctamente, a eficácia da quimioprofilaxia aproxima-se dos 100% (Nelson, 2012). Os compostos recomendados incluem avermectinas (selamectina e ivermectina) e milbemicinas (milbemicina oxima e moxidectina). O protocolo determinado pelo ESCCAP (2012) indica a administração mensal destes compostos durante o período que decorre entre os 30 dias anteriores ao início da época de transmissão do agente (normalmente entre Abril e Outubro) até aos 30 dias seguintes ao término da época. Em zonas endémicas o período de

aplicação pode ser estendido a todo o ano. Nestas condições, os fármacos são eficazes contra as L3 e L4 que se desenvolveram nos 30 dias anteriores, e no caso de animais com idade inferior a seis meses podem promover ainda a eliminação de outros endoparasitas (Nelson, 2012). Qualquer que seja o protocolo empregue recomenda-se aferição prévia da microfilarémia e, em animais com mais de 7 meses deve-se primeiro excluir infecção por adultos de *D. immitis* ou *D. repens* (ESCCAP, 2012).

Nos últimos anos têm sido levantados alertas no que concerne a possíveis resistências dos vermes nemátodos a alguns destes compostos, como a ivermectina (Prichard, 2005). Dado que esta característica é seleccionada na descendência, perante uma possível variante resiliente, Nelson (2012) advoga a administração de tratamento adulticida com doxiciclina e melarsomina. A doxiciclina, ao eliminar a bactéria simbiote *Wolbachia*, compromete a potencial transmissão desta característica, enquanto a melarsomina procede à eliminação dos vermes adultos. Uma alternativa à quimioprofilaxia e ao possível desenvolvimento de resistências consiste na prevenção da picada do vector (Prichard, 2005).

Uma das situações em que se pode verificar o sucesso destas medidas é na comparação entre cães com acompanhamento veterinário profilático e populações de cães em canis sem esta protecção, onde as prevalências da doença são claramente superiores (Cancrini *et al.*, 2000). Adicionalmente verifica-se que para uma dada redução de hospedeiros reservatórios sob tratamento profilático, ocorre um declínio relativamente maior na prevalência da doença em cães não protegidos (American Heartworm Society, 2012).

Os dados de prevalência de infecção por *D. immitis* em humanos permitem perceber um padrão semelhante à distribuição geográfica da dirofilariose canina na Europa, ou seja, maioritariamente no sul do continente mas em expansão nas regiões a norte. A seroprevalência em humanos parece estar directamente relacionada com a manutenção de reservatórios da infecção, como cães e cães silvestres, e com a alta concentração de populações de vectores (Genchi *et al.*, 2005b). As infecções em humanos são consideradas acidentais, já que o parasita não atinge a maturidade neste hospedeiro, e os portadores são normalmente assintomáticos. Todavia, o parasita pode dar origem a nódulos pulmonares benignos que podem ser inicialmente confundidos como tumores malignos (Simón, López-Belmonte, Marcos-Atxutegi, Morchón & Martín-Pacho, 2005).

## **Capítulo 4 – Rastreio de doenças caninas de transmissão vectorial numa população de cães polícias/militares**

### **1. Objectivos**

Neste trabalho pretendeu-se efectuar um rastreio de agentes de CVBD em amostras sanguíneas de cães polícias/militares da GNR. Como objectivos adicionais, pretendeu-se incidir sobre a relevância destes agentes nas populações de cães militares e policiais, enquanto se propõe uma reflexão sobre os contributos e condicionantes da detecção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo.

### **2. Material e métodos**

#### **2.1. Caracterização da população amostrada**

Durante o período compreendido entre Janeiro e Junho de 2009, foram enviadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL amostras sanguíneas de 129 cães pertencentes ao efectivo da GNR. A população amostrada foi assim definida neste momento em particular, representada por uma amostra empírica (com amostragem de conveniência), do efectivo canino da GNR na primeira metade de 2009. De acordo com a informação prestada pelos Médicos Veterinários da Divisão de Veterinária da GNR, os cães estavam todos assintomáticos na altura da colheita sanguínea. De referir que após a recepção das amostras, procurou-se obter dados relativos à idade, sexo e raça dos cães, contudo foi apenas possível recolher esta informação em 97 dos 129 animais testados. Na apresentação das proporções destas características da população, só serão considerados os 97 animais que dispõem desta informação.

#### **2.2. Colheita e processamento das amostras**

As amostras de sangue total foram colhidas por punção da veia jugular e divididas por dois tubos, um com anti-coagulante *Ethylene Diamine Tetra acetic Acid* (EDTA) para pesquisa de hemoparasitas e *Dirofilaria* spp., e um tubo seco para obtenção de soro para pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum* por IFI. As amostras foram então enviadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL e mantidas em refrigeração até à elaboração dos protocolos de pesquisa.

#### **2.3. Metodologia**

A pesquisa de agentes de CVBD nesta população foi concebida em função dos recursos disponíveis. Para este efeito, recorreu-se a duas técnicas de detecção com base na observação directa do agente – o esfregaço sanguíneo clássico por escorregamento para

detecção de *Babesia* spp., *Mycoplasma* spp., *Anaplasma* spp., *H. canis*. e *E. canis*; e a técnica de *Knott* modificada para detecção de *Dirofilaria* spp. – e uma técnica serológica baseada na demonstração de anticorpos, a IFI, para detecção da infecção por *L. infantum*. As técnicas utilizadas para a identificação de parasitas nas amostras seguiram os protocolos vigentes no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL., no que respeita ao limiar de positividade (serologia) ou critérios de positividade (esfregaços sanguíneos e teste de *Knott*).

### **2.3.1. Técnica de imunofluorescência indirecta para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania***

O título de anticorpos corresponde ao inverso do valor de maior diluição de soro em que for observada fluorescência. Neste estudo considerou-se como limiar de positividade soros com títulos de anticorpos  $\geq 1:80$ . A partir deste valor, efectuaram-se diluições crescentes de 1/160 e de 1/320. Diluições superiores, como 1/640 ou mais elevadas, não foram utilizadas neste estudo devido ao material disponível para a execução do trabalho prático. Foram usados para controlo positivo um *pool* de soro de cães com título  $\geq 1/320$  e para controlo negativo um *pool* de soro de cães negativos, provenientes da seroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL. A técnica de IFI foi realizada com base no protocolo incluído no *Kit Leishmania-Spot IF* (Laboratório Biomérieux, França, Ref. 75 931) a seguir descrito:

- a. As lâminas com antigénio foram retiradas do frigorífico e colocadas à temperatura ambiente durante 15 minutos;
- b. Preparou-se o PBS (Biomérieux, França, Ref. 75 511), diluindo-o em 1 litro de água destilada;
- c. Preparou-se o PBS-Tween 80, por junção de 1 mililitro de Tween 80 (Merck, Alemanha, Ref. 822 187) a 1 litro do preparado anterior;
- d. Descongelou-se as amostras de soro à temperatura ambiente;
- e. Homogeneizou-se as amostras recorrendo ao agitador;
- f. Na placa de diluição, depositou-se 195  $\mu$ l de PBS nos poços da primeira coluna (coluna 1);
- g. De seguida depositou-se 50  $\mu$ l de PBS no poço da coluna 2;
- h. Juntou-se 5  $\mu$ l de soro na coluna 1;
- i. Com o volume de 50  $\mu$ l fez-se a diluição do conteúdo da coluna 1 para a coluna 2, correspondendo à diluição de 1/80;
- j. Com a micropipeta em volume de 10  $\mu$ l fez-se a diluição e retirou-se 10  $\mu$ l para o poço da lâmina;
- k. Colocou-se 10  $\mu$ l de controlo positivo e seleccionou-se outro poço para colocar 10  $\mu$ l de controlo negativo;

- l. Incubou-se durante 30 min a 37°C, em câmara húmida;
- m. Lavagem das lâminas:
  - i. 1ª Lavagem, rápida com PBS/Tween 80;
  - ii. 2ª Lavagem, 5 minutos, mergulhadas num recipiente com PBS/Tween 80;
  - iii. 3ª Lavagem, 5 minutos, mergulhadas noutro recipiente com PBS/Tween 80;
  - iv. Passou-se as lâminas por água destilada;
  - v. Secou-se bem as lâminas;
- n. Depositou-se 10 µl do conjugado BioMérieux (anticorpos anti-IgG total de cão) diluído em solução de azul de Evans (BioMérieux, França, Ref. 75 491) em cada poço, incluindo os controlos;
- o. Incubou-se durante 30 minutos a 37 °C em câmara húmida;
- p. Lavagem igual ao passo *m*;
- q. Secaram-se muito bem as lâminas e fez-se a montagem definitiva colocando uma gota (1:10) de Fluoprep (BioMérieux, França, Ref. 75 521) em cada poço, e cobriu-se a lâmina com uma lamela de 50x24 mm;
- r. Efectuou-se de imediato a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus DP10, Modelo BX50F), no comprimento de onda de 425 nanómetros;

### **2.3.2. Técnica de esfregaços sanguíneos.**

Para pesquisa e identificação de hemoparasitas foram elaborados 129 esfregaços sanguíneos por escorregamento, correspondentes a cada canídeo em amostra. A elaboração do esfregaço consistiu nos seguintes passos:

1. Recolheu-se uma gota de sangue de cada amostra e colocou-se na extremidade da lâmina de observação microscópica;
2. Procedeu-se à extensão do sangue em esfregaço ao longo da lâmina e deixou-se secar por cerca de 30 minutos;
3. Fixou-se com metanol durante 1 minuto;
4. Corou-se o esfregaço com Giemsa puro durante cerca de 30 segundos, seguido de lavagem com água e deixou-se secar ao ar livre;
5. Observação microscópica;

A elaboração do esfregaço tem como objectivo primordial a criação de uma zona de monocamada, onde os eritrócitos quase se tocam sem se sobreporem, e onde os leucócitos estão razoavelmente definidos. Esta disposição favorece a observação integral do maior número de elementos sanguíneos por campo óptico. Simultaneamente é desejável uma coloração efectiva mas com o menor número possível de artefactos como resíduos ou manchas de corante. O esfregaço sanguíneo é uma técnica especialmente sujeita a factores de variabilidade que prejudicam a reprodutibilidade e repetibilidade do exame. Neste

sentido, pretendeu-se definir um protocolo de observação que atenua esta variabilidade e algumas das limitações inerentes à técnica:

1. Avaliação geral da lâmina em ampliação 100x;
2. Observação dos elementos sanguíneos na objectiva de imersão (ampliação 1000x) durante 20-30 minutos, dividido em duas partes: 10-15 minutos na zona da monocamada e outros 10-15 minutos percorrendo as zonas periféricas do esfregaço e/ou zonas onde os leucócitos apresentavam melhor definição;
3. Registo dos parâmetros da avaliação do esfregaço e recolha de imagens de vários campos microscópicos;
4. Repetição da observação nos casos com resultados duvidosos

### 2.3.3. Técnica de Knott (1939) Modificada

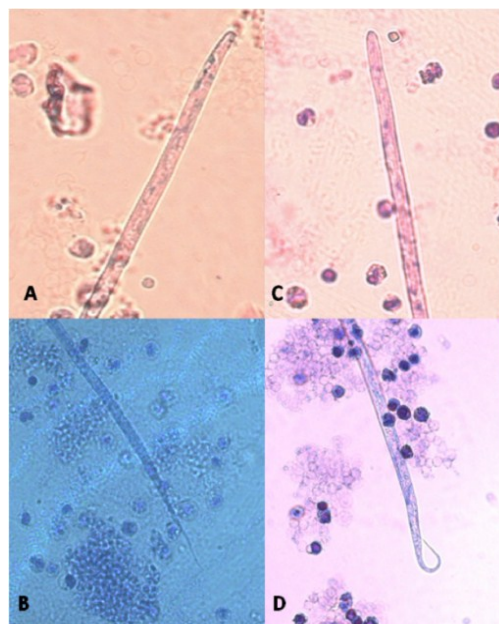
Para identificação de microfilárias no sangue foi usada a técnica de Knott (1939) modificada, adaptada de Bowman (2009). Os passos seguidos foram:

1. Colocou-se 1 ml de sangue de cada animal em EDTA num tubo de centrifugação de 15ml;
2. Adicionou-se 9 ml de formalina a 2%, e homogeneizou-se por agitação e inversão;
3. Centrifugou-se a 1500 rotações por minuto durante 5 minutos e eliminou-se o líquido sobrenadante;
4. Adicionou-se uma gota de azul-de-metileno ao sedimento;
5. Transferiu-se uma gota da mistura para uma lâmina de observação microscópica e aplicando-se uma lamela procedeu-se à observação com a ampliação de 40x. A identificação foi efectuada com ampliações de 100 e 400x;
1. Observaram-se as lâminas e procedeu-se ao registo dos resultados de acordo com a diferenciação morfológica para microfilárias (tabela 4 e figura 5);

**Tabela 4** - Características morfológicas de microfilárias em sangue de cão (Bowman, 2009)

	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Extremidade anterior	Extremidade posterior
<i>D. immitis</i>	290-330 $\mu\text{m}$	5–7	Afilada	Afunilada, recta
<i>D. repens</i>	300-600 $\mu\text{m}$	6–8	Obtusa	Filiforme, curva ventralmente
<i>A. reconditum</i>	260-283 $\mu\text{m}$	4	Obtusa, gancho Cefálico	Em gancho/anzol

**Figura 5** – Extremidade anterior e posterior de *D. immitis* (A, B) e *D. repens* (C, D) visualizadas através do Teste de Knott modificado (Traversa, Di Cesare & Conboy, 2010)



#### 2.4. Análise dos dados

Para a descrição analítica das características da população amostrada e dos resultados obtidos, recorreu-se ao *software Microsoft Office® Excel 2007®* e *SPSS® v.19*.

Para o cálculo da prevalência de infecção por agentes de CVBD e de cada agente detectado, a totalidade da amostra (N=129) foi considerada. Entende-se por prevalência o número total de casos ou focos de uma doença numa determinada população ao longo de um dado período ou num dado instante. A prevalência obtida neste trabalho corresponde a um balanço epidemiológico da população, obtido no momento da testagem (Toma *et al.*, 2004.)



### 3. Resultados

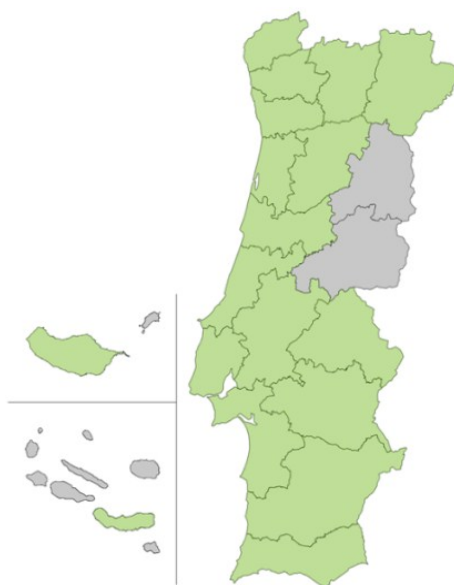
#### 3.1. Características da população amostrada

As amostras recolhidas correspondem a cães distribuídos por várias secções cinotécnicas da GNR, distribuídas por 16 distritos de Portugal continental e 2 Regiões Autónomas; apenas os distritos da Guarda e Castelo Branco não foram representados (figura 6). A distribuição dos cães pelos vários Distritos e Regiões Autónomas encontra-se representada na tabela 5 e no gráfico 1.

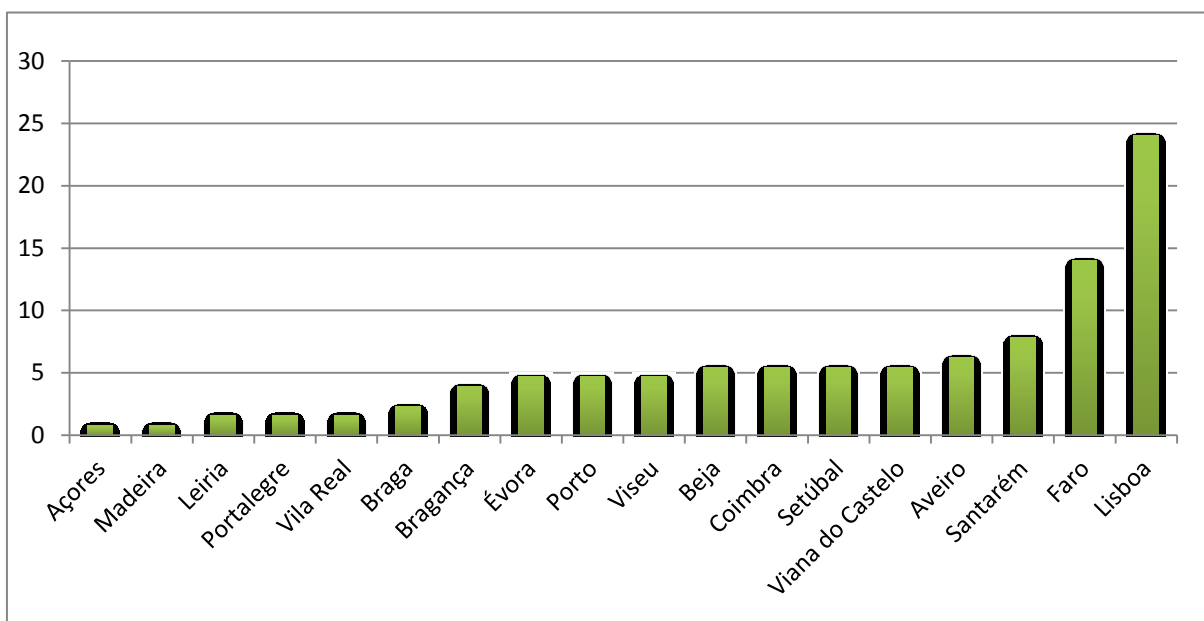
Tabela 5 – Distribuição geográfica dos cães

Localização	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Açores	1	0,8
Aveiro	8	6,2
Beja	7	5,4
Braga	3	2,3
Bragança	5	3,9
Coimbra	7	5,4
Évora	6	4,7
Faro	18	14
Leiria	2	1,6
Lisboa	31	24
Madeira	1	0,8
Portalegre	2	1,6
Porto	6	4,7
Santarém	10	7,8
Setúbal	7	5,4
Viana do Castelo	7	5,4
Vila Real	2	1,6
Viseu	6	4,7
<b>Total</b>	<b>129</b>	<b>100</b>

Figura 6 – Mapa de Portugal, a verde os distritos e regiões autónomas com representação na amostra



**Gráfico 1** – Representação gráfica da distribuição dos cães pelas diversas secções cinotécnicas, onde é possível verificar que o distrito de Lisboa abrange quase um quarto (24%) da população.

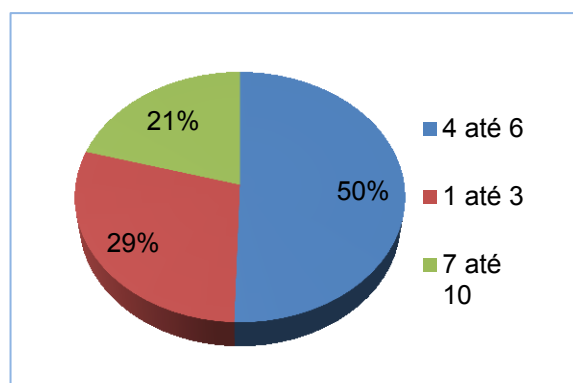


A média de idades obtida foi de 4,9 anos, moda igual a 5 anos, com mínimo de 1 ano e máximo de 10 anos de idade. Por forma a melhor elucidar a distribuição das idades na população amostrada, foram constituídos 3 grupos etários. Esta informação está representada na tabela 6 e gráfico 2.

**Tabela 6** – Grupos etários; frequência absoluta na amostra, frequência relativa, frequência relativa válida (97 animais com informação válida); sem informação em 32 cães.

Grupo etário		Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Frequência relativa válida (%)
Válidos	1-3	28	21,7	28,9
	4-6	49	38,0	50,5
	7-10	20	15,5	20,6
	<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>75,2</b>	<b>100,0</b>
Sem informação		32	24,8	-
<b>Total</b>		<b>129</b>	<b>100,0</b>	<b>-</b>

**Gráfico 2** – Proporção dos grupos etários na população (frequência relativa válida)



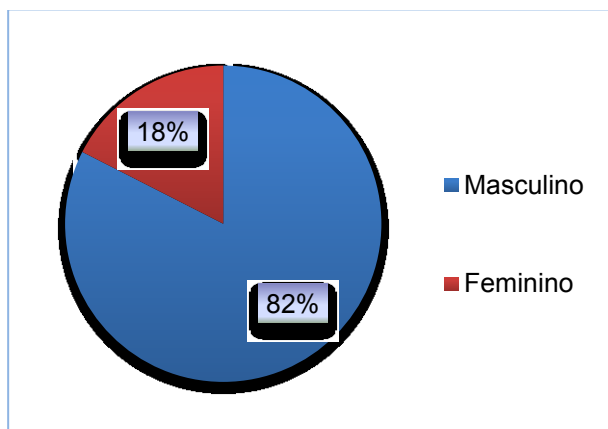
É possível verificar que o grupo etário 4-6 anos representa o maior número de cães e que quase 80% da população apresenta idades até aos 6 anos.

Atendendo à distribuição em termos de sexo na população amostrada (tabela 7, gráfico 3), verifica-se que o número de machos supera largamente o de fêmeas, com 82% de cães machos face a 18% de fêmeas.

**Tabela 7** – Frequência de machos e fêmeas na população; 97 cães com informação válida (frequência relativa válida), 32 informação ausente;

Sexo		Frequência	Frequência relativa (%)	Frequência relativa válida (%)
Válidos	Fêmea	17	13,2	17,5
	Macho	80	62,0	82,5
	<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>75,2</b>	<b>100,0</b>
Sem informação		32	24,8	-
<b>Total</b>		<b>129</b>	<b>100,0</b>	<b>-</b>

**Gráfico 3** – Proporção dos sexos na população (frequência relativa válida)

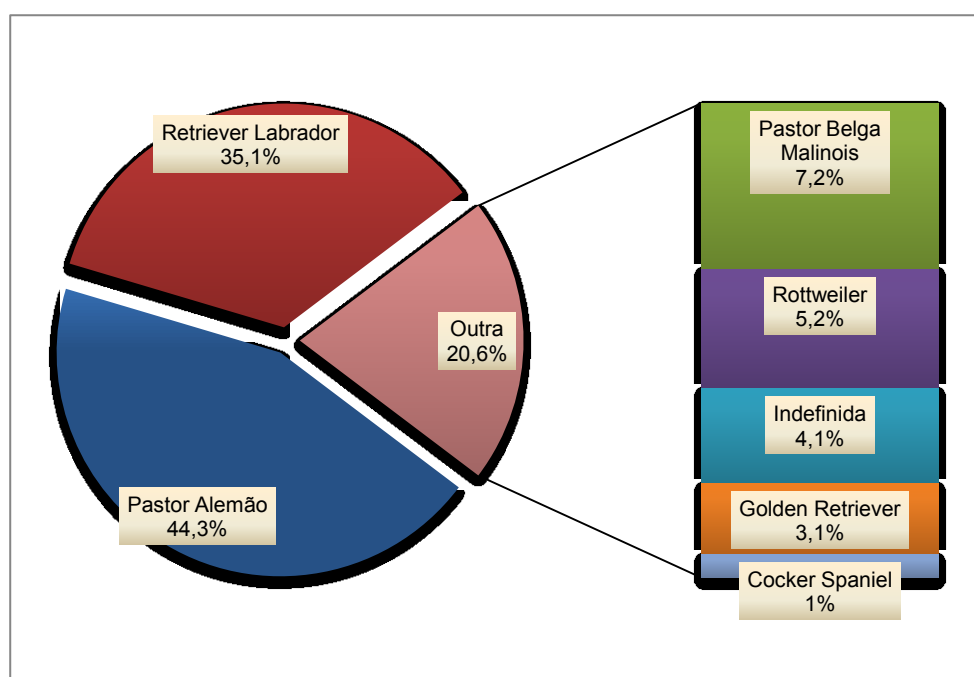


No que respeita às diferentes raças de cada canídeo, (tabela 8 e gráfico 4), verifica-se que praticamente 80% da população é constituída pelas raças Pastor Alemão (44,3%) e Labrador Retriever (35,1%), com os restantes cerca de 20% distribuídos entre o Pastor Belga Mallinois (7,2%), Rottweiler (5,2%), raça indefinida (4,1%), Golden Retriever (3,1%) e Cocker Spaniel (1%).

**Tabela 8** – Frequência de raças na população: 97 dados válidos; 32 sem informação.

	Raças	Frequência	Frequência relativa (%)	Frequência relativa válida
<b>Válidos</b>	Pastor Belga Malinois	7	5,4	7,2
	Pastor Alemão	43	33,3	44,3
	Golden Retriever	3	2,3	3,1
	Rottweiler	5	3,9	5,2
	Retriever Labrador	34	26,4	35,1
	Cocker Spaniel	1	0,8	1,0
	Indefinida	4	3,1	4,1
	<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>75,2</b>	<b>100,0</b>
<b>Sem informação</b>		32	24,8	
<b>Total</b>		<b>129</b>	<b>100,0</b>	

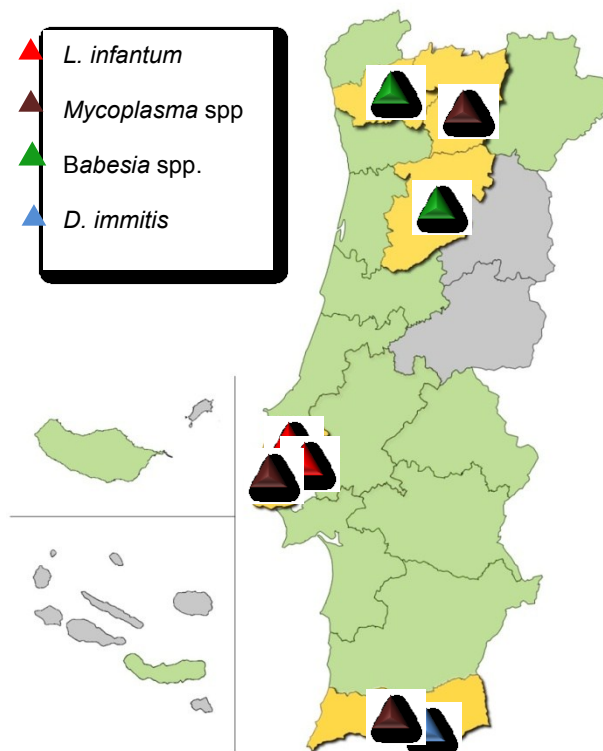
**Gráfico 4** – Proporção das raças na população (frequência relativa válida).



### 3.2. Prevalência de infecções na população amostrada

Um total de 8 cães revelaram infecção por agentes de CVBD, não se tendo registado situações de co-infecção, mas apenas infecções por um agente. Na observação de esfregaços sanguíneos foi possível detectar 2 infecções por *Babesia* spp. e 3 por *Mycoplasma* spp.. Não foram detectados os restantes hemoparasitas em pesquisa, *E. canis*, *H. canis*. e *Anaplasma* spp. O teste de Knott revelou 1 canídeo com infecção por *D. immitis*, enquanto a análise por IFI demonstrou títulos positivos para *L. infantum* em 2 cães. A distribuição geográfica dos casos positivos encontra-se representada na figura 7.

**Figura 7** – Distribuição geográfica dos agentes detectados na amostra: as secções cinotécnicas de Lisboa apresentam o maior número de infecções, com 2 casos de *L. infantum* e 1 de *Mycoplasma* spp.; em seguida, Faro com 2 cães infectados (*D. immitis* e *Mycoplasma* spp.); nos restantes distritos evidenciados ocorreu apenas uma infecção, nas secções cinotécnicas de Viseu e Braga por *Babesia* spp., e em Vila Real por *Mycoplasma* spp.



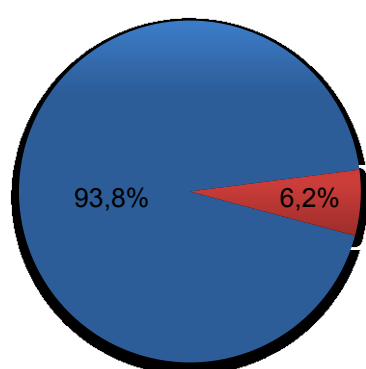
A tabela 9 resume os resultados negativos e positivos obtidos para cada agente e a frequência relativa no seio da população

**Tabela 9** – Resultados da pesquisa por agentes de CVBD na população

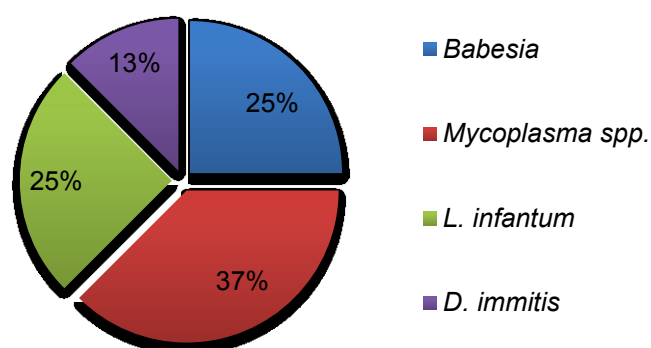
Agentes de CVBD	Frequência	Frequência relativa (%)	Percentagem cumulativa (%)
<i>L. infantum</i>	2	1,6	1,6
<i>D. immitis</i>	1	0,8	2,3
<i>Mycoplasma</i> spp.	3	2,3	4,7
<i>Babesia</i> spp.	2	1,6	6,2
Negativos	121	93,8	100,0
<b>Total</b>	129	100,0	

A expressão dos focos positivos em termos absolutos representa 8 casos de infecção por agentes de CVBD em 129 cães, o que corresponde a uma frequência em termos relativos de 6,2%, (número de eventos/população amostrada). 93,8% dos cães não apresentam infecção (Gráfico 5).

Verifica-se também que *Mycoplasma* spp. é o agente com maior representação nesta população, com 2,3% de cães infectados; por oposição, *D. immitis* surgiu apenas num canídeo (0,8%). *L. infantum* e *Babesia* spp. representam ambas 1,6% de infecções na população. Tendo em conta apenas os focos positivos, *Mycoplasma* representa a maior proporção das infecções, 37% (3/8), enquanto *L. infantum* e *Babesia* spp. correspondem a 25% (2/8), e por último, *D. immitis* com 13% dos casos (1/8) (gráfico 6).



**Gráfico 5** – Cães positivos a agentes de CVBD na população a vermelho, face aos negativos a azul



**Gráfico 6** – Frequência relativa dos agentes no total das infecções

Verificou-se também que, para um dos cães que evidenciava infecção por *Mycoplasma* spp., não foram disponibilizados dados relativos à idade, sexo e raça.

A tabela 10 resume as informações disponíveis para os restantes 7 casos positivos.

**Tabela 10** – Dados relativos aos cães infectados

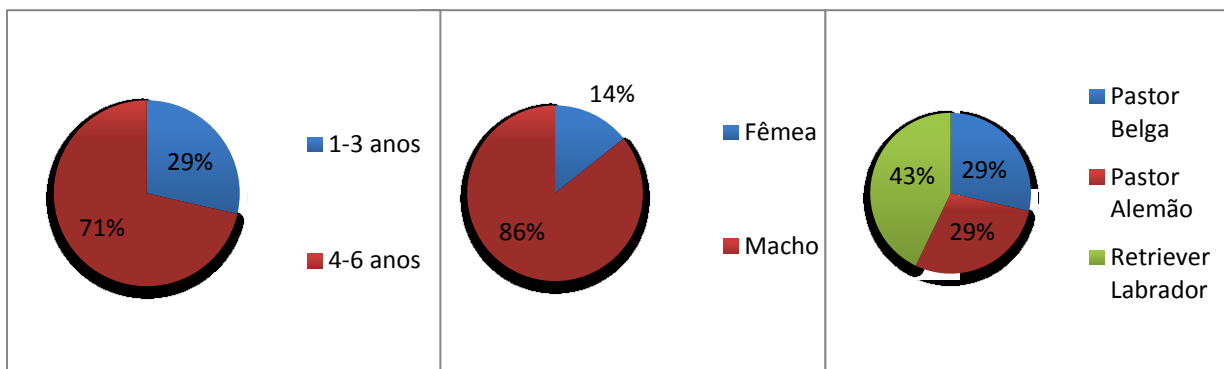
CVBD-positivos	Grupo etário	Sexo	Raça
<i>L. infantum</i>	1-3	Fêmea	Pastor Belga
	1-3	Macho	Pastor Belga
<i>Babesia</i> spp.	4-6	Macho	Pastor Alemão
	4-6	Macho	Retriever Labrador
<i>Mycoplasma</i> spp.	4-6	Macho	Pastor Alemão
	4-6	Macho	Retriever Labrador
<i>D. immitis</i>	4-6	Macho	Retriever Labrador

Verifica-se assim que o grupo etário 4-6 anos representa 71% das infecções (5/7) enquanto o grupo etário 1-3 anos apresenta os restantes 29% (2/7) (Gráfico 7). Os machos evidenciam 86% (6/7) das infecções (Gráfico 8), enquanto as percentagens se distribuem mais uniformemente entre raças, apenas com ligeira evidência na raça Retriever Labrador (Gráfico 9).

**Gráfico 7** – Distribuição das infecções por faixa etária

**Gráfico 8** – Distribuição das infecções por sexo

**Gráfico 9** – Distribuição das infecções pelas raças



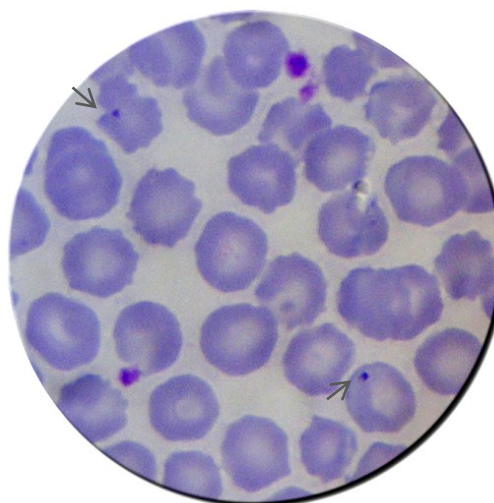
### 3.3. Esfregaços sanguíneos: *Babesia* spp.e *Mycoplasma* spp.

Nos cães de Viseu e Braga, foram observadas inclusões eritrocitárias em conformação de anel, com cerca de 1-2  $\mu\text{m}$ , compatíveis com formas pequenas de *Babesia* spp. (figuras 8 e 9).

**Figura 8** – Forma intra-eritrocitária de *Babesia* sp. num canídeo de Braga (Ampliação aproximada 1000x)



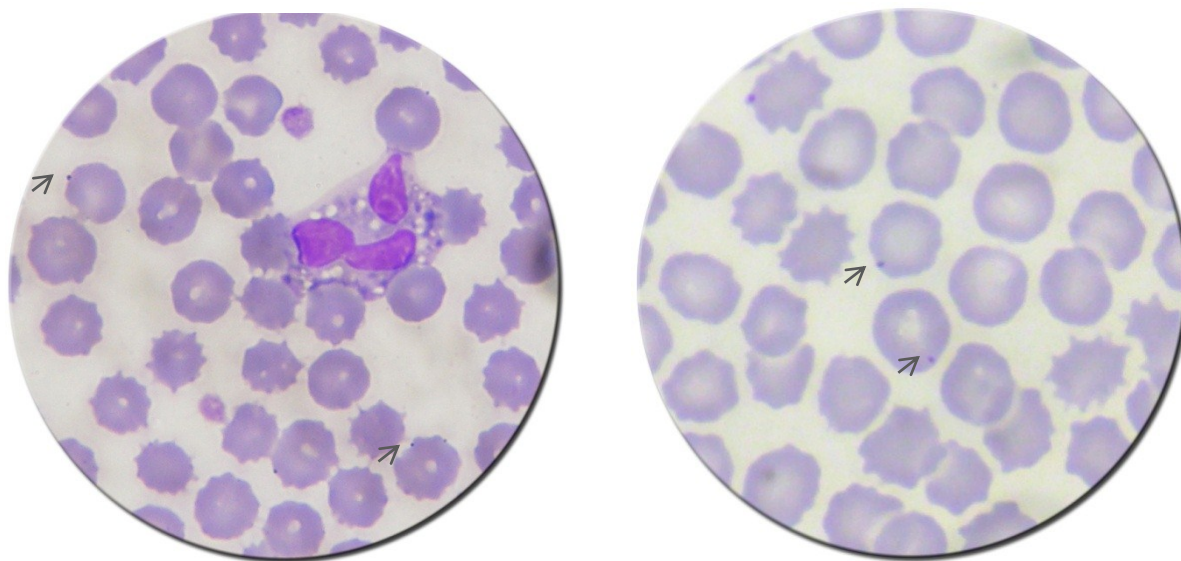
**Figura 9** – Várias formas de *Babesia* spp. num canídeo de Viseu (Ampliação aproximada 600x)



As formas de *Mycoplasma* spp. observadas nos três cães assumiam a forma de cocos, maioritariamente à periferia dos eritrócitos, formando depressões na membrana da célula (figura 10)

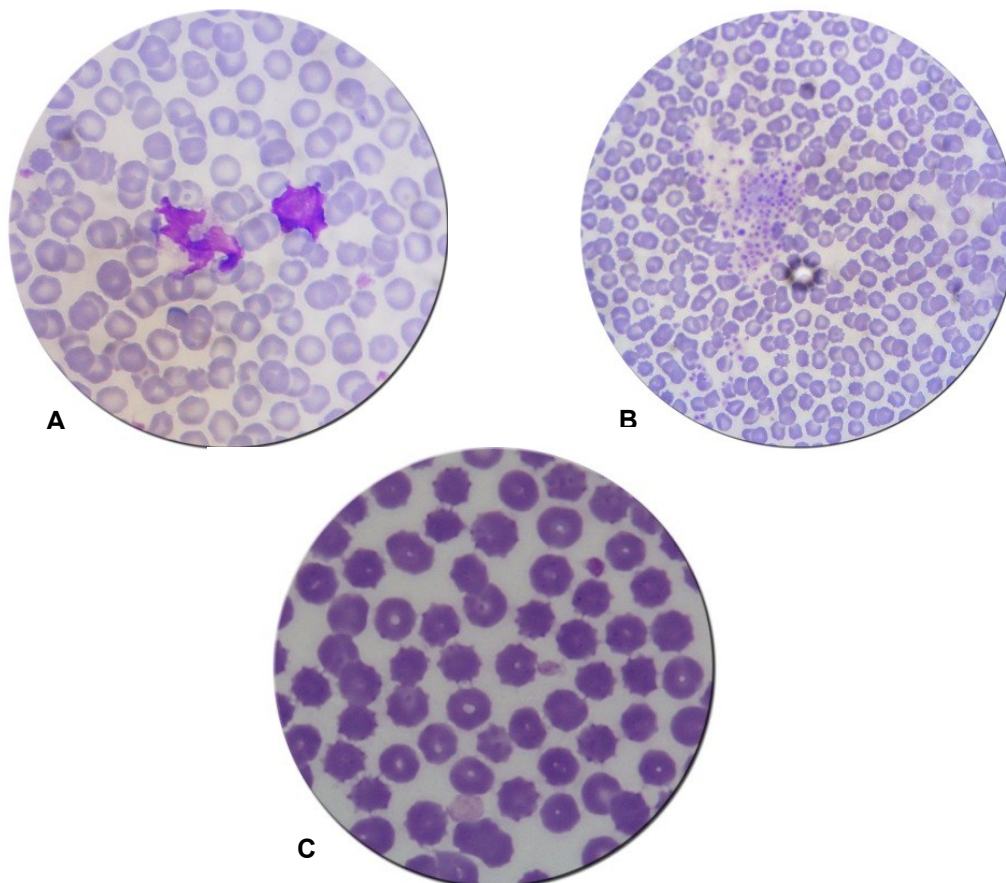


**Figura 10** – Dois campos ópticos de esfregaços sanguíneos de cães infectados por *Mycoplasma* spp. (ampliação aproximada: 500x)



Durante a pesquisa foi possível observar que muitos dos esfregaços apresentavam artefactos que de certa forma comprometem a identificação morfológica de alguns dos agentes. Casos de deformação ou degeneração citoplasmática dos leucócitos e agregação plaquetária foram particularmente frequentes, e em menor escala, artefactos que deformam os eritrócitos (células crenadas ou equinócitos) (figura 11).

**Figura 11** – **A:** degeneração citoplasmática de leucócitos (ampliação aproximada 300X); **B:** agregação plaquetária (ampliação aproximada 200X); **C:** equinócitos (Ampliação aproximada 400X)

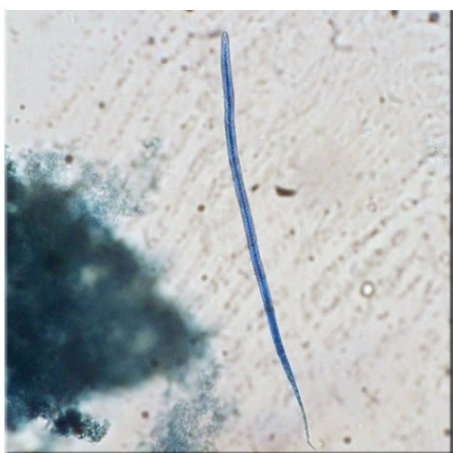




### 3.4. Teste de Knott: *Dirofilaria immitis*

Foram realizados 129 testes de Knott, dos quais apenas um foi positivo para microfilárias, identificadas como *D. immitis* (figura 12). Dado que foram produzidos esfregaços sanguíneos de todas as amostras, foi ainda possível detectar uma microfilária no esfregaço do animal positivo para Knott (figura 13).

**Figura 12** – Microfilária de *D. immitis* isolada em fundo de eritrócitos lisados, teste de knott;



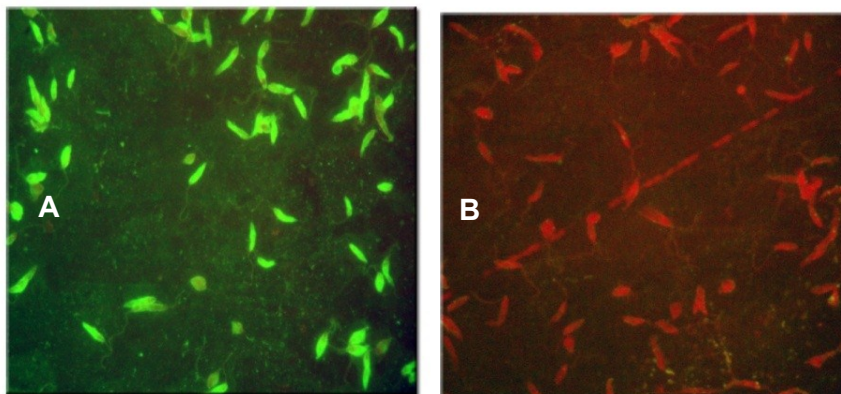
**Figura 13** – Microfilária em esfregaço sanguíneo (200x)



### 3.5. IFI: *Leishmania infantum*

A análise por IFI foi positiva em dois cães de Lisboa, um evidenciando títulos de anticorpos máximos para *L. infantum* de 1:80 e outro que atingiu os 1:320. Não se registaram casos duvidosos nem foram efectuadas diluições acima de 1:320 (figura 14).

**Figura 14** – Microscópio de fluorescência; A: aspecto do teste positivo, com promastigotas evidenciando intensa coloração verde fluorescente correspondente a uma amostra positiva a *L. infantum*; B: teste negativo, promastigotas sem fluorescência (Oc. 10X e Obj. 40x).



#### 4. Discussão

O rastreio incidiu sobre um total de 129 cães assintomáticos, pertencentes ao efectivo da GNR. Em termos absolutos, foram detectados 8 casos positivos de infecção por agentes de CVBD, correspondendo a uma frequência relativa de 6,2% na população. Particularmente, pelo esfregaço sanguíneo foram demonstradas 3 infecções por *Mycoplasma* spp. (2,3%) e 2 por *Babesia* spp. (1,6%); o teste serológico IFI demonstrou anticorpos para *L. infantum* em dois cães (1,6%); e o teste de Knott revelou um caso de microfilárias de *D. immitis* (0,8%).

Na ausência de dados relativos a qualquer outro rastreio para agentes de CVBD nos efectivos da GNR, estes resultados devem ser encarados como um balanço epidemiológico da população. Os dados obtidos demonstram inequivocamente a infecção por vários agentes transmitidos por vectores em cães sem sintomatologia aparente, e salientam a importância destes animais como hospedeiros reservatórios de alguns agentes zoonóticos. Adicionalmente, a informação recolhida encontra paralelo noutros estudos que já demonstraram que, pela natureza da sua actividade, as populações de cães militares ou policiais constituem grupos de risco à transmissão de CVBD (Davoust *et al.*, 1994).

Ainda, devido à natureza desta população, e dado que não se dispõe de informações completas em relação às características de todos os animais pesquisados (nomeadamente, idade, sexo ou raça), não se achou conveniente proceder ao cálculo de associações estatísticas entre a presença de infecção e as variáveis demográficas disponíveis. Como referido, a amostra foi obtida por conveniência e desta forma não é surpreendente que os focos de infecção acompanhem as características demográficas predominantes. É de facto possível verificar um maior número de casos em Lisboa e Faro, os dois distritos com mais cães representados, com 49 amostras das 129 estudadas (38%). Também a distribuição das infecções por grupo etário, sexo e raças, parece acompanhar a frequência destas características na população, com mais casos no grupo etário mais representado (4-6 anos), entre os machos (82% na amostra) e nas raças Retriever Labrador e Pastor Alemão, que em conjunto representam 80% dos cães testados.

A influência de características como a idade, sexo ou raça, parece ter expressão na frequência de infecções por alguns agentes. Raças como o Boxer, o Cocker Spaniel, Rottweiler e Pastor Alemão parecem mais susceptíveis à infecção por *L. infantum*, por exemplo (Solano-Gallego *et al.*, 2011). A raça Pastor Alemão constitui grande parte da amostra, todavia, os cães infectados por este parasita são ambos da raça Pastor Belga Mallinois, e a explicação para a susceptibilidade de raças parece apenas residir no uso frequente destes animais como cães de guarda (Sideris, Papadopoulou, Dotsika & Karagouni, 1999). De igual forma, a maior prevalência de algumas CVBD em machos suscita o mesmo raciocínio. No que respeita à idade, é sabido que a leishmaniose canina tende a ocorrer mais em cães jovens ou idosos. As duas infecções por *L. infantum* ocorreram em animais com idade inferior a 3 anos, o que vai ao encontro destes dados. Já

na dirofilariose canina em zonas endémicas, alguns factores de risco geralmente associados à ocorrência da doença parecem ser menos relevantes (sexo, raça, tipo de pelagem) por oposição a características como o porte (grande), a idade (superior a 3 anos) e a permanência no exterior (McCall *et al.*, 2008). A maioria dos cães em amostra é de porte grande e com habitual permanência no exterior, mas a população é relativamente jovem. O extenso período pré-patente de *D. immitis* leva a que a infecção tenha menor incidência em animais jovens, o que pode ter sido preponderante no reduzido número de infecções na população deste trabalho.

Na verdade, a população em estudo reúne um conjunto de características que gera uma certa ambiguidade na susceptibilidade às CVBD. Do ponto de vista clínico os animais constituem uma população de baixo risco: assintomáticos, maioritariamente jovens ou de média idade (80% abaixo dos 6 anos), diariamente submetidos a considerável atenção por parte do dono, conjugada com um suporte nutricional de alta qualidade e profilaxia parasitária. Ainda que os dados relativos à profilaxia individual não estejam disponíveis, em termos gerais os serviços veterinários da GNR definem um padrão geral de administração de anti-parasitários tópicos e orais, reforçada por um acompanhamento diário do militar em cada binómio, sobretudo no que respeita à infestação por carraças. Ainda que este enquadramento suponha um bom esquema profilático, os dados são inespecíficos quanto aos fármacos administrados a cada cão no período que antecedeu a colheita das amostras sanguíneas. A profilaxia parasitária representa um factor relevante nestes cães, já que pela natureza da sua actividade, a população de cães de trabalho aqui representada está frequentemente exposta a vectores (Davoust *et al.*, 1994). Do ponto de vista epidemiológico, o contexto dos animais suscita alguns factores de risco na transmissão de CVBD, enfatizados pela elevada mobilidade, associada a longos períodos de permanência no exterior (diurnos e nocturnos), exposição a ambientes silvestres e contacto frequente com outros cães. Por outro lado, estes padrões podem variar entre as várias secções cinotécnicas, e como tal, a susceptibilidade da amostra pode ser extraordinariamente diversificada.

Em termos globais, os estudos disponíveis sobre a prevalência de CVBD em cães polícias/militares reflectem esta ambivalência nos seus resultados, com prevalências elevadas ou diminutas caso a caso. Numa pesquisa por hemoparasitas em esfregaço sanguíneo de 57 cães do Batalhão de Operações Especiais da Polícia Militar Brasileira, apenas um cão evidenciou uma mórula de *E. canis* (Paludo *et al.*, 2002); em Madrid, 131 cães polícia evidenciaram 2,29% de seroprevalência para este agente (Sainz, Tesouro, Rodriguez, Mayoral & Mazzucchelli, 1995). Por outro lado, em cães polícia na Venezuela, verificou-se 36% de prevalência de erliquiose canina, através de análise molecular (Unver, Perez, Orellanda, Huang & Rikihisa, 2001). Também na Venezuela, cães militares testados

por PCR revelam 16% de infecção por *A. platys* (Huang, Unver, Perez, Orellana & Rikihisa, 2005).

Em França, 86% de 43 cães do exército revelaram anticorpos anti-*Babesia* (Elosniewski *et al.*, 1997), enquanto que apenas um caso de *Babesia* sp. foi detectado por esfregaço sanguíneo em 38 cães polícia eslovacos (Škardová, Škarda, Sesztáková, Štefančíková & Peko, 2002). De novo no Brasil, não se detectaram microfilárias em 40 cães militares pesquisados através do Knott e da gota fresca (Araújo, Marcondes, Bastos & Sartor, 2003); contudo, pelos mesmos métodos, 18% de 710 cães polícia/militares evidenciaram dirofilariose na Eslováquia (Miterpáková *et al.*, 2010). A testagem serológica não revelou resultados positivos para este agente numa população de cães militares submetidos a profilaxia com moxidectina, na região endémica do arquipélago da Nova Caledónia (Watier-Grillot, Marié, Cabre & Davoust, 2011).

Em boa verdade, na maioria dos estudos em que se detectam baixas prevalências de agentes infecciosos em cães polícia/militares, os autores apontam estes resultados como consequência de uma crescente implementação profilática para as CVBD. Em 2000, um grupo de cães militares dos EUA, destacados na Sícia, revelou 60% de seroprevalência para *L. infantum* (Orndorff, Cooper, Smith & Ryan, 2000). Sete anos depois, uma nova população canina destacada na mesma base por igual período foi analisada por métodos serológicos e moleculares, sem que se tenha detectado qualquer caso de infecção pelo mesmo parasita. Os autores concluem que a atenção despertada pelo estudo inicial levou à instituição de medidas profiláticas simples, como a aplicação de coleiras de deltametrina, que determinaram a redução da prevalência observada *a posteriori* (Jerrod & Killian, 2007). Também num estudo que comparou um grupo de cães do exército francês submetido a profilaxia mensal com fipronil, com outro grupo não tratado, os resultados de seroprevalência de *E. canis* são muito superiores no grupo não controlado (Damé *et al.*, 2003). Resultados semelhantes têm sido obtidos em estudos que comparam as seroprevalências entre cães militares e cães de caça, uma população frequentemente negligenciada em termos de profilaxia (Sainz *et al.*, 1995). As diferenças entre estudos epidemiológicos em populações de cães polícias/militares parecem dever-se sobretudo às diferentes intensidades profiláticas. Em última análise, no rastreio efectuado neste trabalho, as baixas prevalências registadas e a ausência de infecções por *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Hepatozoon*, podem ser consequência tanto destas características das populações de cães polícias/militares, como da natureza da infecção de cada agente e das limitações inerentes aos métodos usados na sua detecção.

No caso de *L. infantum*, o facto dos animais estarem assintomáticos por altura da colheita não representa menor probabilidade de detecção do agente, dada a elevada prevalência de infecções sub-clínicas em regiões endémicas como Portugal. A natureza insidiosa da infecção por *L. infantum* já se provou problemática em efectivos de cães militares de regiões

endémicas (Jerrod, & Killian, 2007). Adicionalmente, a colheita das amostras decorreu entre Janeiro e Junho de 2009, uma época relativamente propícia à pesquisa de *L. infantum* no Mediterrâneo (Sideris, Papadopoulou, Dotsika & Karagouni, 1999). Ainda que não hajam dados objectivos para cada animal relativamente à prevenção para a leishmaniose canina, sabe-se que a recolha de amostras antecede a distribuição de vacinas actualmente disponíveis. Ainda assim, 1,6% de infecções nesta população pode ser considerado um valor aquém da prevalência média em Portugal de 6%, aproximando-se mais das seroprevalências obtidas em canis militares no sudeste Francês (0,7-2,9%), em cães sujeitos a uso de coleira de deltametrina (Aoun *et al.*, 2009, Roqueplo, 2003).

As duas infecções foram registadas em cães sediados em Lisboa, sendo que a Área Metropolitana de Lisboa é um dos três focos endémicos principais em Portugal (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008). Num recente estudo com 1185 cães – 557 assintomáticos e 628 suspeitos de CVBD, provenientes de diversos pontos do país – o distrito de Lisboa apresenta a maior prevalência de infecção por *L. infantum* (7,9%) (Cardoso, Mendão & Madeira de Carvalho, 2012). Uma justificação para as elevadas prevalências nas grandes cidades como Lisboa ou Madrid é o crescente fluxo de habitantes e animais de companhia para a periferia destas cidades, um território que já anteriormente promovia a proliferação de vectores, completando o ciclo infeccioso da doença (Campino, 2002). Por outro lado, as áreas suburbanas favorecem a permanência de cães errantes, reconhecidamente susceptíveis à infecção e transmissão do agente (Cortes, Afonso, Pires & Campino, 2007).

Dadas as características da amostra e os recursos disponíveis, os cães foram testados para *L. infantum* através do método da IFI. Apesar do considerável número de opções de diagnóstico já desenvolvidas, a IFI permanece o método mais usado no sul da Europa, essencialmente em função do custo aliado à possibilidade da apreciação do título de anticorpos (Ferroglia & Vitale, 2006). A técnica demonstra ainda elevada especificidade em regiões onde não ocorrem parasitas do género *Trypanosoma*, como o caso do território português, todavia a ausência do historial de viagem de cada animal nesta amostra caracterizada por grande mobilidade, não permite excluir a possibilidade de reacção cruzada. Ainda que este método seja consensualmente recomendado, numa amostra de animais assintomáticos em áreas endémicas, o já complexo diagnóstico de leishmaniose canina torna-se ainda mais desafiante (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A IFI demonstra sensibilidades geralmente altas no diagnóstico da doença e é por isso frequentemente usado na prática clínica, no entanto pode ser altamente variável em estudos epidemiológicos de animais assintomáticos, com variações entre os 21 e os 100% (Maia & Campino, 2008). Nestas condições não se define um método preferencial, antes deve-se sempre que possível empregar mais do que um teste (Otranto *et al.*, 2009c). As restrições nos métodos serológicos devem-se em parte às diferenças na reacção do sistema imune do hospedeiro. A seroconversão ocorre em média aos 5 meses pós infecção, mas pode tardar

por vários anos, ocorrendo falsos negativos durante este período (Oliva *et al.*, 2006). Existem ainda casos em que o nível de anticorpos circulantes é transiente ou em que a seroconversão não chega a ocorrer (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Por outro lado os anticorpos podem persistir por longos períodos após a eliminação do agente, originando falsos positivos (Baneth *et al.*, 2008). De forma a alargar o espectro de detecção do teste poderiam ter sido realizadas diluições de 1:40 (Silva & Braga, 2008). O limiar de positividade é usualmente definido entre 1:40 e 1:160 e de facto, a prevalência real de infecção numa amostra pode ser subestimada quando se define um limiar de positividade superior a 1:40 (Ferroglia & Vitale, 2006). Por outro lado, estudos de prevalência em animais assintomáticos podem obter os mesmos valores para 1:40 ou 1:80 (Figueiredo *et al.*, 2010). Ainda, um limite superior garante maior especificidade (Dantas-Torres, Brito & Brandão-Filho, 2006). Tanto em Portugal como nos países da bacia mediterrânica, a prevalência de infecção em animais assintomáticos difere consoante, a duração do estudo, limiares de positividade ou a técnica de detecção empregue. Em comum com outros estudos, os resultados aqui obtidos sublinham a importância de animais positivos sem sintomatologia em regiões endémicas (Miró *et al.*, 2007; Cortes *et al.*, 2007). Dadas as limitações da técnica, a repetição do teste ou a combinação com outros meios de diagnóstico são aconselhadas, sem que no entanto nenhum garanta sensibilidade de 100% em animais assintomáticos (Baneth & Aroch, 2008).

No que respeita à pesquisa por esfregaço sanguíneo, foram detectados 2 casos de infecção por piroplasmas em cães pertencentes às secções cinotécnicas de Viseu e Braga, correspondendo assim 1,6% de infecções na população amostrada. Em ambos os casos, as inclusões eritrocitárias em conformação de anel, com cerca de 1-2 µm, são compatíveis com a morfologia de uma forma pequena de piroplasma (Kjemtrup *et al.*, 2006). Todavia, a detecção de uma forma pequena no cão não indica infecção por *B. gibsoni*, pelo menos não mais do que será indicativa de *B. microti-like* ou *T. equi* (Zahler *et al.*, 2000). Em boa verdade, as formas grandes também podem surgir em anel já que a merogonia assíncrona do parasita suscita que várias morfologias ocorram no mesmo esfregaço (Chauvin *et al.*, 2009). Na fase inicial da infecção, quando os parasitas estão em rápida multiplicação, as formas típicas de cada espécie podem não ser evidentes (Birkenheuer, 2012). No entanto, dado o quadro assintomático, é presumível que não se trate de uma fase inicial de infecção aguda, mas antes de portadores sub-clínicos. Assim, assume-se que as inclusões observadas correspondam a formas pequenas de *Babesia* spp.

Na ausência de dados concretos sobre a incidência de *B. gibsoni* em Portugal, é conhecida a ocorrência de *B. microti-like* no norte do país, isolada por análise molecular em cães da região transmontana, nas imediações de Viseu e Braga (Simões *et al.*, 2011). O parasita é também endémico, mais a norte, na região espanhola da Galiza (Garcia, 2006). Adicionalmente, o suposto vector de transmissão deste piroplasma, *I. hexagonus*, ocorre no

País com particular predominância na região de Viseu (Santos-Silva *et al.*, 2011). Estes dados tornam-se razoavelmente preditivos que a espécie detectada nestes cães seja efectivamente *B. microti-like*. Todavia, tendo em conta a ocorrência de *B. gibsoni* na vizinha Espanha (Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2013; Suarez, Espino, Goicoa, Fidalgo & Santamarina, 2001) e na Europa central (Hartlet *et al.*, 2007), também é possível reunir dados que apontam no sentido de infecção por este agente. Foi já demonstrado que *B. gibsoni* tende parasitar preferencialmente eritrócitos imaturos e na verdade algumas das formas detectadas no esfregaço localizavam-se em policromatófilos de coloração basofílica, compatíveis com eritrócitos imaturos (Murase, Iwai & Maede, 1993). Além disso, *B. gibsoni* parece enquadrar-se melhor com as características da amostra em estudo, uma vez que esta espécie induz frequentemente infecções de menor virulência que *B. microti-like*, de curso sub-clínico ou crónico com parasitemia flutuante, compatível com o quadro assintomático da população.

Portugal é um país endémico para a piroplasmose canina nomeadamente por *B. canis*, *B. vogeli* e *B. microti-like* (Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010a). Os estudos moleculares no país indicam normalmente prevalências superiores ao obtido neste trabalho, contudo decorrem de amostras de cães com suspeita clínica de babesiose e portanto não providenciam um termo de comparação adequado (Cardoso *et al.*, 2010a; Yisaschar-Mekuzas, Jaffe, Pastor, Cardoso & Baneth, 2013). Atendendo apenas à análise por esfregaço sanguíneo em cães portugueses assintomáticos, outros estudos demonstram resultados de prevalência igualmente reduzidos, ou mesmo ausentes, ainda que enquadrados pelas limitações do método (Figueiredo *et al.*, 2007; Caeiros, 2012). Ensaaios experimentais de Boozer & Macintire (2005) estabeleceram as 4-6 semanas pós-infecção como o período em que a parasitemia é maior e, como tal, mais facilmente detectável na observação microscópica – 1,9% a 6% dos eritrócitos infectados. Esta observação vai ao encontro de outros autores que referem que o diagnóstico por esfregaço sanguíneo pode não ser eficaz fora deste período.

Também por observação microscópica, três cães evidenciaram cocos basofílicos na periferia dos eritrócitos, identificados como *Mycoplasma* spp., dada a impossibilidade de definir a espécie em causa, algo por enquanto apenas acessível através dos métodos moleculares. Os dados da prevalência dos hemoplasmas em Portugal são entretanto escassos. As informações disponíveis no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL revelam 30% de esfregaços positivos para *Mycoplasma* spp. numa amostra com 162 representantes, entre cães, gatos e lobos (Seixas, Alho, Guerra & Madeira de Carvalho, 2012). Num estudo sobre a prevalência e distribuição geográfica destes agentes em Portugal e nos países do Mediterrâneo, a maior prevalência (obtida por PCR) foi em Portugal. Dos 50 cães analisados, 20 (40%) foram positivos para *M. haemocanis* (Novacco *et al.* 2010).

Em Espanha, 26 em 182 cães testados revelaram-se positivos para *M. haemocanis*, com um deles a acusar co-infecção por “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (Roura *et al.*, 2010). Assim na ausência de informação sobre infecções por “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” em Portugal, pensa-se que a infecção ocorra por *M. haemocanis*. Embora não se tenha observado a forma típica de *M. haemocanis* em linhas de cocos sobre os eritrócitos, sabe-se que em animais sem sintomatologia com baixa parasitemia esta morfologia pode não ocorrer (Weiss & Tvedten, 2012).

A aparente tendência para mais infecções por *M. haemocanis* na Península Ibérica não se encontra em estudos de prevalência de hemoplasmas em França (Kenny, Shaw, Beugnet, & Tasker, 2004) ou no Sudão (Inokuma *et al.*, 2006) onde foram detectados mais casos de “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” entre a população canina.

Tanto nos casos de *Mycoplasma* spp., como nos de *Babesia* spp., o reduzido número de formas encontradas na observação microscópica não suscitou a necessidade de cálculos de parasitemia. Ainda no esfregaço sanguíneo não foram detectados os restantes hemoparasitas propostos para pesquisa, *H. canis*, *E. canis* e *Anaplasma* spp.

Em relação a *H. canis*, não estão descritas influência de género ou raça na infecção pelo parasita, porém alguns estudos descrevem maior incidência em animais jovens, porventura em razão de um sistema imunitário imaturo (Gavazza, Bizzeti, Papini, 2003; Mundim, Morais, Tavares, Cury & Mundim, 2008). A maior incidência em animais jovens e a baixa patogenicidade do agente poderia indicar que a população aqui estudada, seria susceptível à ocorrência de infecção por *H. canis*, o que não se verificou. Os dados de prevalência deste parasita em Portugal não são abundantes. Num estudo com 331 cães, maioritariamente de canis, obtiveram-se 18% de infecções em pesquisa por esfregaço da camada flogística e 21% através do PCR (Menn, Lorentz & Naucke, 2010). Porém, resultados através de esfregaço sanguíneo clássico em animais sem sintomatologia específica revelam apenas 2,1% de infecções no norte do país (Figueiredo, 2007) ou 1,8% a sul (Alexandre, 2005). A parasitemia está normalmente associada à gravidade da doença mas pode ser bastante variável, desde 0 a 100% de neutrófilos infectados em sangue periférico (Baneth *et al.*, 2003). Na verdade até mesmo em animais sintomáticos não é raro que a parasitemia se situe abaixo de 0,1% de leucócitos infectados (Vincent *et al.*, 1997; Mundim *et al.*, 2008). Estes valores, mesmo que não inferiores ao limite de detecção por microscopia óptica, implicam uma observação cuidada que se pode revelar ineficaz, e assim justificar a ausência de infecções na população em estudo.

Não foram também detectados casos de infecção por *A. platys*. Embora a ocorrência deste parasita em Portugal esteja confirmada (Cardoso *et al.*, 2010b), não existem para já estudos de prevalência em grande escala. Na Europa o agente é reportado frequentemente com prevalência elevada nos países mediterrânicos como Espanha (19,2%) e Itália (23%) (Yabsley *et al.*, 2008; Otranto & Dantas-Torres, 2010). Em Cabo Verde, 7,7% em 130 cães



revelaram *A. platys* por PCR, todos eles infestados por *R. sanguineus*, o que contribui para a suspeita desta carraça como vector do agente (Götsch *et al.*, 2009). A pesquisa do agente em esfregaço sanguíneo traz frequentemente resultados ambíguos. Nalguns casos as pesquisas são morosas e sem resultados, enquanto noutros podem surgir até 97% de plaquetas infectadas. Dado que a manifestação mais evidente de ATC é a trombocitopénia, a observação de inclusões torna-se mais difícil à medida que o número de plaquetas diminui (Ferreira *et al.*, 2007b). Falsos positivos podem também ocorrer durante episódios de inflamação, em que a activação das plaquetas induz a formação de inclusões granulares no centro da plaqueta, facilmente confundíveis com o parasita (Ferreira *et al.*, 2007b).

A ocorrência de AGC por *A. phagocytophilum* em Portugal não parece ser um dado concreto. Os estudos actualmente disponíveis baseiam-se em seroprevalências determinadas por IFI, o que não permite discernir a espécie em causa dada a eventualidade de reacção cruzada com *A. platys* (Inokuma *et al.*, 2002; Strik *et al.*, 2007; Harvey, 2012a; Lappin, 2012). A ocorrência de *A. platys* confirmada por PCR (Cardoso, Tuna, Vieira, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2010b), face à ausência de informação ao mesmo nível para *A. phagocytophilum*, não permite ignorar a possibilidade de que os dados de seroprevalência para *A. phagocytophilum* sejam na verdade decorrentes de reacção cruzada com *A. platys*. Num recente estudo de Santos *et al.* (2009), os autores propõem que os resultados de 55% de seroprevalência para *A. phagocytophilum* se devam a reacção cruzada, uma vez que a posterior análise por métodos moleculares revelou 100% de homologia com *A. platys*. Resultados idênticos são obtidos noutro estudo, envolvendo a detecção serológica e molecular em populações de roedores de várias regiões do país (Santos *et al.*, 2008). Carradae *et al.*, (2009) alerta precisamente para a sobrestimação da prevalência de *A. phagocytophilum* perante estas evidências. Não obstante, em Portugal o parasita foi já identificado a nível molecular em carraças das espécies *I. ricinus* e *I. ventralloi*, e infecções em equinos e humanos estão confirmadas (Santos-Silva, Almeida, Bacellar & Dumler, 2004; Santos, Bacellar & Dumler, 2008). Adicionalmente, o parasita é actualmente um dos agentes transmitidos por vectores em maior expansão na Europa, tanto a nível de espécies domésticas e silvestres, como em seres humanos (Stuen, 2007). Neste contexto, *A. phagocytophilum* foi equacionado na pesquisa, sem que se tenham obtido casos positivos.

Ao esfregaço sanguíneo as inclusões de *A. phagocytophilum* até podem surgir em grande número, entre 7-30% dos neutrófilos, contudo parecem ser apenas visíveis 4-14 dias pós-infecção, persistindo por 4 a 8 dias (Weiss e Tvedten, 2012). Alguns autores definem um período máximo de infecção patente de 28 dias o que limita a probabilidade de captar mórulas na observação microscópica (Carradae *et al.*, 2009; Harvey, 2012a). Apesar do número de cães expostos ao agente em regiões endémicas, traduzido de estudos de seroprevalência com resultados muitas vezes acima dos 50%, a maior parte dos cães

imunocompetentes aparenta debelar a infecção de forma natural (Diniz & Breitschwerdt, 2012). Desta forma, as limitações do método e a natureza da infecção anteviam a ausência de casos positivos.

De igual modo, não foram também detectados casos de infecção por *E. canis*, um resultado em certa medida antecipável em função das limitações do método. A doença é endémica em Portugal e o agente é frequentemente reportado em efectivos militares na Europa do Sul (Davoust *et al.*, 1994; Damé *et al.*, 2003). A nível nacional a seroprevalência é elevada, desde 24% a 50% (Menn *et al.*, 2010; Bacellar, Dawson, Silveira, & Filipe, 1995). Através do PCR, Alexandre (2009) reporta 22% de infecções em 55 cães na região do Algarve, mas demonstra apenas um caso positivo através da detecção de mórulas em esfregaço sanguíneo. De forma idêntica Figueiredo, (2007) detecta apenas uma mórula em esfregaços sanguíneos de 10 cães com infecção por *E. canis* confirmada por métodos moleculares. Na verdade, o considerável número de autores que sublinham as dificuldades inerentes à detecção de *E. canis* por observação microscópica em animais sintomáticos, tornava improvável a detecção do agente neste trabalho (Rikihisa, 1991; Mylonakis, *et al.*, 2003; Allison & Meinkoth, 2010; Weiss & Tvedten, 2012; ESCCAP, 2012). A parasitemia parece apenas evidente durante a fase aguda da doença e estima-se que só em 4% dos casos surjam mórulas em quantidade detectável no esfregaço sanguíneo (Waner, Strenger & Keysary, 2001). Numa comparação entre o diagnóstico por esfregaço sanguíneo e o PCR para *E. canis* e *A. Platys*, verificou-se que apesar de o PCR revelar mais infecções de *E. canis*, a observação do esfregaço sanguíneo evidenciou menos de metade de casos de *E. canis* do que de *A. platys* (Ramos *et al.*, 2009). A insensibilidade deste método decorre também da elevada probabilidade de falsos positivos já que várias situações podem mimetizar uma mórula de *E. canis*, desde inclusões intracelulares inespecíficas como material fagocitado, a plaquetas sobrepostas ao leucócito (Harvey, 2001).

O esfregaço sanguíneo permite aferir infecção por hemoparasitas sobretudo durante a manifestação aguda da doença, altura em que a parasitemia é mais elevada, e por conseguinte, quando este método permite o diagnóstico de forma expedita, num só processo. Contudo, a pesquisa de hemoparasitas em amostras provenientes de animais assintomáticos pode ser um processo moroso e que nem sempre culmina em resultados conclusivos. Em geral, alguns agentes são mesmo dificilmente identificáveis em citologia em infecções agudas (ex: erliquiose, anaplasmoze) e ocasionalmente um diagnóstico citológico presuntivo tem de ser confirmado por outros métodos laboratoriais. Estimar a sensibilidade do esfregaço sanguíneo clássico na detecção de hemoparasitas é um exercício difícil tendo em conta o número de variáveis que concorrem para a sua eficácia: desde a experiência do operador, à qualidade do esfregaço ou do microscópio, passando pela natureza da infecção em pesquisa. Contudo, prevê-se um limite mínimo de 0,01% de parasitemia para que o agente se torne detectável numa observação de 20 minutos por um técnico experiente

(Böse, Jorgensen, Dalglish, Friedhoff & De Vos, 1995). Com o intuito de aprofundar esta questão, Mylonakis *et al.*, (2003) realizaram uma comparação entre diferentes métodos de observação citológica na detecção de *E. canis* (esfregaço de sangue periférico clássico, esfregaço da camada flogística, de medula óssea e de linfonodos). Cada método foi observado por um técnico experiente durante quatro períodos crescentes. Os autores concluíram então que o método mais sensível consiste na observação de esfregaço da camada flogística, durante 60 minutos, correspondentes a cerca de 1000 campos em objectiva de imersão (1000x). Tomando este exemplo, a obtenção da melhor sensibilidade possível na observação microscópica pode tornar o procedimento extenuante e certamente impraticável em determinados contextos. É também evidente, que além da experiência do operador, determinadas técnicas podem otimizar a detecção de alterações sanguíneas.

A elaboração de um esfregaço sanguíneo que favoreça a observação de hemoparasitas inicia-se logo na colheita das amostras sanguíneas. Neste estudo, as amostras sanguíneas foram colhidas a partir da veia jugular ou veia cefálica por padrão, o que não favorece a detecção de alguns agentes. *Ehrlichia*, *Babesia*, *Mycoplasma* e *Hepatozoon*, estão descritos como mais frequentes em amostras colhidas a partir de sangue capilar, como por punção da orelha por exemplo (Rubini *et al.*, 2008). Já durante a colheita, o excesso de EDTA (por sangue a menos no tubo de colheita ou homogeneização inadequada) pode provocar degeneração citoplasmática dos neutrófilos, vacuolização dos monócitos e destruição plaquetária (Barger, 2010). Estes artefactos foram frequentes nos esfregaços sanguíneos observados (Figura 11). Neste contexto, a observação de parasitas com tropismo para estes elementos sanguíneos, como *E. canis*, *H. canis* e *Anaplasma* spp., fica naturalmente limitada e é um factor a considerar perante a ausência destes agentes na amostra.

Após a colheita, o intervalo de tempo até à preparação da pesquisa deve ser o mais breve possível. Amostras de sangue em EDTA por mais de 6-12h podem causar degeneração de leucócitos e agregação plaquetária (Walker, 2007), destacamento de hemoplasmas dos eritrócitos (Valden *et al.*, 2009) e separação de *H. canis* dos leucócitos (Vincent-Johnson, Macintire & Baneth, 1997). Dada a complexidade logística inerente à proveniência das várias amostras sanguíneas de diversas regiões do país, é provável que intervalos de tempo comprometedores possam ter ocorrido em alguns casos.

A formação de artefactos na elaboração do esfregaço sanguíneo contribui de sobremaneira para a ocorrência de falsos negativos, ou falsos positivos, que devem ser considerados no resultado final. O tempo de secagem é vital na preparação das lâminas de modo a evitar a deformação dos elementos sanguíneos, sobretudo os eritrócitos (Valden *et al.*, 2009). Eritrócitos crenados ou equinócitos foram alguns dos artefactos mais frequentes na observação (Figura 11), o que prejudica a observação de piroplasmas e hemoplasmas. Os precipitados de corante podem também ser facilmente confundidos com cocos bacterianos ou inclusões parasitárias, dando origem a falsos positivos, sobretudo no caso dos

hemoplasmas. Estes artefactos foram distinguidos tendo em conta o tamanho, o contorno, a coloração, ou por estarem acima do plano focal da célula (Weiss & Tvedten, 2012).

A área observada é de grande importância perante a evidente impossibilidade de garantir que a totalidade do esfregaço seja escrutinada. Para a diferenciação dos elementos sanguíneos, a zona da monocamada no final da lâmina garante a melhor possibilidade de observar individualmente cada elemento e é essencial para qualquer propósito numa avaliação hematológica (Willard & Tvedten, 2012). Outras características no padrão de distribuição dos elementos sanguíneos ditam que devido à menor densidade, eritrócitos infectados por piroplasmas tendem a acumular-se nas zonas periféricas; e no caso de *Hepatozoon*, a melhor zona para observação é geralmente o início da lâmina imediatamente anterior à zona espessa (Irwin, 2005). Várias colorações podem apresentar vantagens na identificação de um agente em particular, contudo a coloração de Giemsa usada neste trabalho é consensualmente indicada em qualquer pesquisa de hemoparasitas. Também outros métodos de observação microscópica com base em concentração sanguínea podem beneficiar de maior sensibilidade, como no caso dos esfregaços da camada flogística para detecção de *Hepatozoon* ou *Ehrlichia* (Sasaneli *et al.*, 2010). Com efeito, é possível otimizar individualmente a elaboração do esfregaço sanguíneo para a detecção de determinado hemoparasita, no entanto, os recursos laboratoriais e o tempo dispendido na observação assumiriam uma dimensão incomparavelmente superior ao método usado neste trabalho. Não obstante, pretendeu-se adoptar algumas destas premissas e assim cada esfregaço foi observado por um período mínimo de 20-30 minutos, incluindo a zona de monocamada e zonas periféricas da lâmina. Nos casos positivos, duvidosos, ou em esfregaços de baixa qualidade, a observação foi repetida. Com este protocolo pretendeu-se estabelecer uma dose razoável de consistência que favorece a pesquisa e antecipa algumas das limitações intrínsecas à técnica.

Os métodos moleculares constituem uma alternativa largamente mais específica com capacidade para identificação ao nível de espécie, contudo a sensibilidade nem sempre atinge os 100% e os custos/disponibilidade desta técnica não são comparáveis ao esfregaço sanguíneo (Nicolaiewsky *et al.*, 2001; Aktas, Altay & Dumanli, 2005). Os testes serológicos são frequentemente usados em estudos de prevalência de larga escala por demonstrarem contacto com o agente mesmo em portadores assintomáticos, contudo devem ser entendidas as limitações inerentes a este método. Questões como, o hiato entre a inoculação do agente e a seroconversão, as reacções cruzadas, ou a persistência de anticorpos após eliminação da infecção, devem ser interpretadas nos resultados de um teste serológico (Vargas-Hernández *et al.*, 2012).

Em determinados contextos da prática clínica, a análise microscópica directa de esfregaços sanguíneos pode ser preponderante, não só por complemento a análise laboratorial hematológica (confirmando ou confrontado estes resultados), como na avaliação do número

de leucócitos e plaquetas numa situação de urgência. Perante uma suspeita de hemoparasitas com quadro de anemia e trombocitopénia, a instituição da terapêutica pode ser melhor direccionada por uma breve observação de esfregaços sanguíneos; por oposição, a testagem por métodos moleculares ou serológicos pode não providenciar informação em tempo útil (Kjemtrup & Conrad, 2006).

Em boa verdade, os limites da sensibilidade e especificidade do esfregaço sanguíneo, sendo transversais aos vários hemoparasitas, não inviabilizam a detecção em animais assintomáticos. Alguns estudos demonstram resultados de observação microscópica concordantes com os obtidos por outros métodos serológicos ou moleculares: em casos de babesiose (Duh, Tozon, Petrovec, Strasek & Avsic-Zupanc, 1998), anaplasmoze trombocitotrófica (Ferreira *et al.*, 2007b) hepatozoonose (Otranto *et al.*, 2011) e hemoplasmoze (Kemming *et al.*, 2004b). Igualmente, a pesquisa de microfilárias pelo teste de Knott pode fornecer resultados concordantes com os obtidos por pesquisa de antígeno numa população sem suspeita de dirofilariose canina (Rocha, 2010; Pereira, 2010).

O teste de Knott evidenciou a presença de microfilárias com morfologia compatível com *D. immitis*, num canídeo sediado no distrito de Faro. Em Portugal não existe registo de ocorrência de *D. repens*, por oposição a maioria dos restantes países do sul do continente europeu que frequentemente reportam infecções por este parasita, por vezes até com maior predominância que *D. immitis* (Cancrini *et al.*, 2000; Pantchev *et al.*, 2011). No entanto, os dados disponíveis indicam a presença de outros nemátodes filarídeos como *A. reconditum*, e como tal torna-se imperativa a distinção de *D. immitis* (Menn *et al.*, 2010).

Os valores de prevalência de dirofilariose canina em Portugal, um país endémico para a doença, são em geral superiores ao reportado nesta população. Num estudo que data de 1996, as maiores prevalências foram obtidas em cães da Ilha da Madeira (30%) e do Algarve (12%) (Araújo, 1996 citado por McCall *et al.*, 2008). Recentemente, os resultados de Cardoso *et al.* (2012) confirmam estes dados, mantendo a ilha da Madeira como zona hiperendémica e a maior prevalência de dirofilariose canina em Portugal continental na região algarvia (5.1%), e definindo um padrão epidemiológico de distribuição das filarioses caninas com prevalência crescente de Norte para Sul. No presente trabalho o único caso de infecção por *D. immitis* reportado provém do Algarve, o que de certa forma vai ao encontro destes dados.

Atendendo à pesquisa de microfilárias por Knott, um estudo internacional com 331 cães portugueses assintomáticos testados pelo Knott, revelou 5,3% de infecções por microfilarias (Menn *et al.*, 2010). Já Alho *et al.*, (2012) reporta uma prevalência de 12% em cães de canis portugueses testados por Knott e pelo método de ácido-fosfatase. Também através do método usado neste trabalho, Pereira da Fonseca *et al.* (1991) indica uma prevalência de 16,7% (40/239) em cães da Região do Ribatejo e Oeste. Na sub-região do Baixo Vouga

obteve-se uma prevalência total de 9.3% numa população de 204 animais assintomáticos, com base em pesquisa microscópica e antigénica (Rocha, 2010).

A identificação de microfilárias em circulação pelo método de *Knott* é razoavelmente preditivo da infecção por nemátodes adultos. Menos de 1% das infecções são patentes e não antigenémicas, como tal a probabilidade de falsos positivos é limitada a determinados casos: sobrevivência de microfilárias após a morte dos adultos, infecção de cachorros durante a gestação a partir de cadela com elevada carga microfilarémica, ou identificação morfológica errada (Courtney & Zeng, 2001). No entanto, um rastreio de dirofilariose canina será sempre limitado quando baseado apenas na pesquisa por microfilárias. O número de larvas circulantes é relevante na sensibilidade deste método, sendo apontado um mínimo de 100 larvas por ml de sangue para que sejam detectáveis, tanto em métodos de concentração sanguínea como o *Knott*, como no simples exame de “gota fresca” (Mylonakis, Papadopoulos, Koutinas, Paitaki & Leontides, 2004). A microfilarémia também apresenta um aparente carácter sazonal e sub-periódico, ou seja, os maiores níveis de larvas circulantes são detectados respectivamente durante o verão e durante as horas crepusculares e nocturnas (Bowman & Atkins, 2009). Consoante a altura em que a colheita ocorre, o número de microfilárias pode estar reduzido a 5-20% da contagem obtida no período óptimo (Panchev *et al.*, 2011). Estas premissas não foram consideradas durante a colheita das amostras sanguíneas, o que de certa forma limita a sensibilidade do teste subsequente. Além do mais, falsos negativos podem ocorrer nos casos em que o hospedeiro infectado com adultos não evidencia microfilarémia, algo comum em regiões endémicas onde se estimam cerca de 30% de infecções ocultas (ESCCAP, 2012).

Os testes de antígeno providenciam a melhor forma de detecção de *D. immitis*, disponível na forma de *kits* rápidos, contudo, a pesquisa por microfilárias está sempre recomendada para confirmar os resultados, identificar o paciente como reservatório de infecção, ou quantificar a carga de microfilárias previamente à administração de um microfilaricida (American Heartworm Society, 2012). Para infecções com microfilarémia considerável e passível de provocar reacção aquando da administração de profiláticos, os testes de detecção de microfilárias apresentam sensibilidade próxima dos 100% (Vezzani *et al.*, 2008). Perante indicações ambíguas dos testes morfológicos, a discriminação entre as diferentes filárias infectantes pode ainda beneficiar de resultados mais objectivos através de técnicas moleculares (Rishniw *et al.*, 2006).

Consistente com o descrito até aqui, é perceptível que o conhecimento do ciclo de vida de cada parasita e a combinação de métodos de detecção de diversa natureza, são claramente desejáveis no diagnóstico de agentes infecciosos. O conhecimento das várias técnicas de diagnóstico disponíveis determina as que melhor servem cada propósito, conquanto que o melhor protocolo envolve várias abordagens, desde os exames laboratoriais de rotina aos

testes mais específicos. Neste seguimento, teria sido desejável estabelecer um contraponto aos resultados obtidos através de outros métodos de diagnóstico.

Outras limitações deste trabalho prendem-se com o hiato de tempo entre a colheita das amostras e a realização deste trabalho, aliado à logística envolvendo o envio das amostras das diversas proveniências. Estas condições limitaram o acesso a dados relativos à população, e a cada canídeo em particular, que teriam enriquecido o trabalho. Adicionalmente, dado que alguns dos agentes têm demonstrado infecção por transmissão vertical, que muitas vezes segue um curso sub-clínico, o historial de infecções por CVBD na genealogia de cada canídeo seria um valor acrescentado. Por outro lado, foi possível obter informação acerca dos animais entretanto eutanasiados; nestes, incluem-se o canídeo infectado com *D. immitis* e um dos cães infectados por *Babesia*. Estes animais estariam actualmente com 7 e 9 anos de idade respectivamente, e portanto ainda abaixo da idade máxima observada na amostra, possivelmente no activo. Contudo, por ter sido impossível determinar a razão subjacente à eutanásia, estes dados carecem de relevância.

## 5. Conclusão

A par da (re) emergência das CVBD na Europa, e particularmente na área da parasitologia, surge um crescente interesse entre a comunidade científica, do qual Portugal não se exclui. Pela natureza da sua actividade, efectivos de cães de trabalho podem representar populações sob especial risco de infecção.

Neste estudo foi possível demonstrar a infecção por *Mycoplasma* spp. (2,3%), *Babesia* spp. (1,6%), *L. infantum* (1,6%), e *D. immitis* (0,8%); não tendo sido detectados os outros agentes propostos à pesquisa como *E. canis*, *H. canis*, e *Anaplasma* spp.. Os resultados obtidos indicam assim uma prevalência bruta de 6,2% de infecções por agentes de CVBD, num efectivo canino com funções militares e policiais aparentemente assintomático. Estes resultados põem em evidência não apenas a exposição dos cães a vários agentes de CVBD, como também a evolução sub-clínica que muitas vezes caracteriza estas infecções.

Nestas condições, a detecção dos agentes pode constituir uma tarefa complexa, que deve envolver o contexto do animal e mais do que um método de diagnóstico que, de forma combinada, permitam colmatar as limitações inerentes a todas as técnicas disponíveis. Consideradas estas limitações, é assim evidente que os resultados obtidos podem subestimar a prevalência real de CVBD nestes animais.

Ainda assim, a maioria dos animais (93,8%) encontrava-se aparentemente livre de infecção, o que em grande medida pode dever-se à profilaxia aplicada individualmente, no sentido de evitar o contacto com os vectores. De acordo com outros estudos já publicados, esta abordagem permanece como um dos meios mais eficazes na prevenção das CVBD.

Em última análise, as conclusões aqui retiradas poderão suscitar mais estudos de rastreio em cães polícias/militares, envolvendo a detecção de agentes e/ou exposição aos vectores,

que não só contribuam para o conhecimento do impacto das CVBD nestas populações, como permitam otimizar o esquema profilático em curso.

## Bibliografia

- Aguirre, E., Tesouro, M., Ruiz, L., Amusategui, I. & Sainz, A. (2006). Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. *Journal of Veterinary Medicine*, (53), 197-200.
- Alexandre, N. (2005). Estudo clínico e epidemiológico da febre botonosa, erlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de cães domésticos do Algarve. Tese de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Alexandre, N., Santos, A., Nuncio, M., de Sousa, R., Boinas, F. & Bacellar, F. (2009). Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *The Veterinary Journal*, 181 (3), 343-344.
- Alho, A.M., Landum, M., Madeira de Carvalho, L.M., Meireles, J, Gonçalves, L. & Belo, S. (2012) Updating the epidemiological status of canine Dirofilariosis in Portugal - Preliminary results. Proceedings of the Third European Dirofilaria Days, European Dirofilaria Society, Parma, June 21-22, 2012, ISBN-13:978-88-903582-6-5, pp. 33. (Comunicação oral).
- Allison, R. & Meinkoth, J. (2010). Anemia Caused by *Rickettsia*, *Mycoplasma*, and *Protozoa*. In D. Weiss & K. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (6th Ed.). (pp.199-210). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Allison, R., Yeagley, T., Levis, K., & Reichard, M. (2011). *Babesia canis rossi* infection in a Texas dog. *American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 40, 345-350.
- Allsopp, M. & Allsopp, B. (2006).Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1081, 509-517.
- Almeida, C. (2010). Prevalência de dirofilariose felina na região do sado. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- American Heartworm Society (2012). Current Canine Guidelines. Acedido em Dez. 2, 2012, disponível em: <http://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/canine-guidelines.html>.
- Annen, K., Friedman, K., Eshoa, C., Horowitz, M., Gottschall, J. & Strauss, T. (2012) Two cases of transfusion-transmitted, *Anaplasma phagocytophilum*. *American Journal of Clinical Pathology*, 137, 562-565.



- Aoun, O., Mary, C., Roqueplo, C., Marié, J., Terrier, O., Levieuge, A. & Davoust, B. (2009). Canine leishmaniasis in south-east of France: screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. *Veterinary Parasitology*, 166(1-2), 27-31.
- Araújo, A. (1996). Canine and human *Dirofilaria immitis* infections in Portugal: a review. *Parassitologia*, 366.
- Araujo, R., Marcondes, C., Bastos & Sartor (2003). Canine dirofilariosis in the region of Conceição Lagoon, Florianopolis, and in the Military Police kennel, Sao José, State of Santa Catarina, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 113, 239-242.
- Armés, S. (2010). Rastreio de *Leishmania infantum* em cães assintomáticos na região de Mafra. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa
- Aktas, M., Altay, K. & Dumanli, N. (2005). Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 133, 277–281
- Atkins C., (2003). Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222, 1221-1223.
- Atkins C., Arther R., Ciszewski D., Davis, W., Ensley, S., Guity, P., Chpade, H., Hoss, H: & Settje, T. (2008). Echocardiographic quantification of *Dirofilaria immitis* in experimentally infected cats. *Veterinary Parasitology*, 158 (3), 164-170.
- Atkins, C. (2010). Heartworm Disease. In S. Ettinger & E. Feldman (Eds.). Textbook of Veterinary Internal Medicine – Vol. 2 (7th Ed.) (pp. 1353-1380). St. Louis, USA: Elsevier Saunders.
- Ayoob, A., Hackner, S. & Prittie, J. (2010). Clinical management of canine babesiosis. *Journal Of Veterinary Emergency And Critical Care*, 20, 77-89.
- Bacellar, F., Dawson, J., Silveira, C. & Filipe, A. (1995). Antibodies against rickettsiaceae in dogs of Setúbal, Portugal. *Central European Journal of Public Health*, 2, 100-102.
- Baneth, G. & Aroch, I. (2008) Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, 175(1), 14-15
- Baneth, G., Koutinas, A., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24 (7), 324-330.
- Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, 181, 3-11.
- Baneth, G. (2012). *Hepatozoon canis* infection. In C. Greene (Ed.), *Infectious Diseases Of The Dog and Cat*. (4th Ed.) (pp.750-757). St. Louis, USA: Saunders, Elsevier.

- Baneth, G. & Solano-Gallego, L. (2012). Canine Leishmaniosis. In: Greene, C. (Ed.), *Infectious Diseases Of The Dog and Cat*.(4th Ed.) (pp.735-749). St. Louis, USA: Saunders, Elsevier.
- Barger, A. (2010). Erythrocyte Morphology. In D. Weiss & K. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (6th Ed.). (pp.144-151). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Bates, P. (2008). *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 340-344.
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Zivicnjak, T. & Cacciò, S. M. (2009). Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*, 39, 843-848.
- Beltz L. (2011). Emerging infectious diseases: a guide to diseases, causative agents, and surveillance. San Francisco, USA: John Wiley& Sons.
- Bigdeli, M., Rafie, S., Namavari, M., Jamshidi, S. (2012).Report of *Theileria annulata* and *Babesia canis* infections in dogs. *Comparative Clinical Pathology*, 21 (3), 375-377.
- Birkenheuer, A., Breitschwerdt, E., Alleman, R. and Pitulle, C. (2002). Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. *American Journal of Veterinary Research*, 63 (10), 1385-1388.
- Birkenheuer, A., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M., & Breitschwerdt, E. (2004).Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Veterinary Parasitology*, 124, 151-160.
- Birkenheuer, A., Horney, B., Bailey, M., Scott, M., Sherbert, B., Catto, V., Marr, H. S., Camacho, A.-T. & Ballman, A. (2010). *Babesia microti*-like infections are prevalent in North American foxes. *Veterinary Parasitology*, 172, 179-182.
- Birkenheuer, A. (2012). Babesiosis. In: C. Greene (Ed.), *Infectious Diseases Of The Dog and Cat*.(4th Ed.) (pp.310-319). St. Louis, USA: Saunders-Elsevier.
- Blonski K., Blödorn-Schlicht N., Falk T., Faye, R. & Clausen O.(2012) Increased detection of cutaneous leishmaniasis in Norway by use of polymerase chain reaction. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 120, 591-596.
- Bogdan, C., Schönián, G., Bañuls, A-L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Rollinghoff, M. and Mertens, R. (2001). Visceral leishmaniasis in a german child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (2), 302-306.
- Boozer, L., & Macintire, D. (2003). Canine babesiosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33, 885-904.

- Boozer, L., & Macintire, D. (2005). *Babesia gibsoni*: an emerging pathogen in dogs. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, 27, 33-42.
- Bobade, P., Oduye, O. & Aghomo, H. (1989). Prevalence of antibodies against *Babesia canis* in dogs in an endemic area. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*. 42, 211-217.
- Bourdeau, P. (2009). Update on canine leishmaniosis: From infection to optimized management [versão electrónica]. In: Proceedings of the Bayer Pre-Congress Symposium ESVD/ECVD, Slovenia, pp.10-27. Acedido em Out. 29, 2012, disponível em: [http://www.baytril.com.au/Libraries/Conferences/Proceedings\\_of\\_the\\_Bayer\\_Pre-Congress\\_Symposium\\_ESVD\\_ECVD\\_2009.sflb.ashx](http://www.baytril.com.au/Libraries/Conferences/Proceedings_of_the_Bayer_Pre-Congress_Symposium_ESVD_ECVD_2009.sflb.ashx)
- Bourdoiseau, G. (2006). Canine babesiosis in France. *Veterinary Parasitology*, 138, 118-125.
- Bowman, A. & Nutall, P. (2008). *Ticks Biology, Disease and Control*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bowman, D. (2009). *Georgis' Parasitology For Veterinarians* (9th Ed.). Missouri, USA: Saunders Elsevier
- Bowman, D. & Atkins, C. (2009). Heartworm Biology, Treatment, and Control. *Veterinary Clinics Of North America - Small Animal Practice*, 39, 1127-1158.
- Brandão, L., Hagiwara, M., Myiashiro, S. (2003). Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with Imidocarb dipropionate. *Veterinary Parasitology*, 114, 253–265.
- Bremer W., Schaefer J., Wagner E., Ewing, S., Rikihisa, Y., Needham, G., Jittapalapong, S., Moore, D. & Stich, R. (2005). Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 131, 95-105.
- Cacciò, S., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R., Slemenda, S. & Pieniazek N. (2002). Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology*, 106, 285-292.
- Caeiros, A. (2012). *Detecção de Babesia spp. E de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no distrito de Lisboa, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Camacho, A., Pallas, E., Gestal, J., Guitian, F. & Olmeda, A. (2001). *Babesia canis* infection in a splenectomized dog. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 95, 17-19.
- Campino, L. (2002). Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. In: J. Farrel (Ed.). *World Class Parasites, Leishmania*. (pp. 45-57). Boston, USA: Kluwer Academic Publishers.

- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23, 859-864.
- Cancrini, G., Allende, E., Favia, G., Bornay, F., Antón, F. & Simón, F. (2000). Canine dirofilariosis in two cities of southern Spain. *Veterinary Parasitology*, 92, 81–86.
- Cardoso L., Costa A., Tuna J., Vieira L., Eyal O., Yisaschar-Mekuzas Y. & Baneth G. (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Veterinary Parasitology*, 156(3-4): 199-204.
- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D. & Baneth, G. (2010a). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*, 3, 27.
- Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas & Baneth G. (2010b). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *The Veterinary Journal*, 183(2), 232-233.
- Cardoso, L., Mendão, C. & Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5, 62.
- Carrade, D., Foley, J., Borjesson, D. & Sykes, J. (2009). Canine Granulocytic Anaplasmosis: a review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1129-1141.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters, T. & Gorenflot, A. (1999). *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 298-303.
- Casiraghi M, Bazzocchi C, Mortarino M, Ottina E, Genchi C. (2006). A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Veterinary Parasitology*, 141, 368-372.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40, 37.
- Clavert, C. & Thomasson, J. (2008). Heartworm Disease. In: L. Tilley, F. Smith Jr., M. Oyama & M. Sleeper. (Eds.) *Manual of Canine and Feline Cardiology*. (4th Ed.) (pp. 183-199). St Louis, USA: Elsevier.
- Compton, S., Maggi, R. & Breitschwerd, E. (2012). *Candidatus* Mycoplasma haematoparvum and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the United States. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35, 557-562.

- Conraths, F. & Mettenleiter, T. (2011). Infectious Diseases Under the Influence of Changing Environmental Factors. In H. Mehlhorn (Ed.), *Progress in Parasitology, Parasitology Research Monographs* Vol. 2. (pp.253-258). Heidelberg, Germany: Springer.
- Cortes, S., Afonso, M., Pires C., & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 1431-1432.
- Courtney C. & Zeng Q. (2001). Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariosis. *Veterinary Parasitology*, 94(3), 199-204.
- Coutinho, M., Bueno, L., Sterzik, A., Fujiwara, R., Botelho, J., De Maria, M., Genaro, O and Linardi, P. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 128, 149–155.
- Coutinho, M. & Linardi, P. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. *Veterinary Parasitology*, 147, 320–325.
- Cox, F. (Ed.) (1993). Modern Parasitology – A textbook of parasitology (2<sup>nd</sup> Ed.). Oxford: Blackwell Science.
- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J., Merino, S., Jefferies, R. & Irwin, P. (2006). New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Veterinary Parasitology*, 142 (3-4), 238-247.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. & Barba-Carretero, J. (2003a). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, 113, 189-201.
- Criado-Fornelio, A., González-del-Río, M., Buling-Saraña, A & Barba-Carretero, J. (2003b). Molecular characterization of a *Babesia gibsoni* isolate from a Spanish dog. *Veterinary Parasitology*, 117(1-2), 123-129.
- Croft, S., Sundar, S. & Fairlamb, A. (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 111-126.
- Damé, B., Marié, J., Mercier, S., Boni, M., Vandeweghe, A., Parzy, D. & Beugnet, F. (2003). Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. *Veterinary Parasitology*, 112, 91-100.
- Dantas-Torres F., De Brito M. & Brandão-Filho S, (2006). Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140, 54-60.
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149, 139-146.

- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152 (3–4), 173-185.
- Dantas-Torres F., Latrofa M., Weigl S., Tarallo V., Lia R. & Otranto D. (2012). *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. *Parasitology Research*, 110(2), 695-698.
- Dautel, H., Dippel, C., Oehme, R., Hartelt, K., & Schettler, E. (2006). Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *International journal of medical microbiology*, 296, 149-156.
- Davoust, B., Toga, I., Dunan, S. & Quilici M. (1994). Leishmaniose dans les effectifs canins militaires. *Médecine et armées*, 22, 33-38.
- Dean, R., Helps, C., Jones, T & Tasker, S. (2008). Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(4), 413-417.
- Dereure, J., Vanwambeke, S., Malé, P., Pratlong, F., Balard, Y. & Dedet, J. (2009). The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*, 9(6), 687-694.
- Desjeux, P. (1996). Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, 14, 417-423.
- Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(3), 239-243.
- Desjeux, P. & Alvar, J. (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97 (1), 3-15.
- Diniz, P. & Breitschwerdt, E. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis). In C. Greene (Ed.), *Infectious Diseases Of The Dog and Cat*. (4th Ed.). (pp.244-254). St. Louis, USA: Saunders, Elsevier.
- Dixit, P., Dixit, A. & Varshney, J. (2010). Evidence of new pathogenic *Theileria* species in dogs. *Journal of Parasitic Diseases*, 34(1), 29-32.
- Di Cicco, M., Downey, M., Beeler, E., Marr, H., Cyrog, P., Kidd, L., Diniz, P., Cohn, L. & Birkenheuer, A. (2012) Re-emergence of *Babesia conradae* and effective treatment of infected dogs with atovaquone and azithromycin. *Veterinary Parasitology*, 187, 23-27.
- Dujardin, J-C., Capino, L., Cañavate, C., Dedet, J-P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y. & Boelaert, M. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (7), 1013-1018.

- Duh, D., Tozon, N., Petrovec, M., Strasek, K. & Avsic-Zupanc, T. (1998). Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Research*, 35, 363-368.
- Dumler, J., Barbet, A., Bekker, C., Dasch, G., Palmer, G., Ray, S., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2145-2165.
- Duprey Z., Steurer F., Rooney J., Kirchhoff L., Jackson J., Rowton E. & Schantz P. (2006). Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 440-446
- Duran-Struuck, R., Jost, C. & Hernandez, A. (2005). *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic) – June 2001. *Veterinary Parasitology*, 133, 323-327
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E. (Eds.) (2006). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria - Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. New York, USA: Springer.
- Dyachenko, V., Pantchev, N., Balzer, Meyersen, A. & Straubinger, R. (2012). First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasites & Vectors*, 5, 49.
- Eldridge, B. & Edman, J. (Eds.). (2003). *Medical Entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Elosniewski, A., Leriche, M., Chavigny, C., Ulmer, P., Donnay, V., Boulois, H., Mahl, P. & Druilhe, P. (1997). Etude du portage asymptomatique de *Babesia canis* en zone d'enzootie. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 20, 75-86.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP ). (2012). Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats. Acedido em Dez. 27, 2012, disponível em: [http://www.esccap.org/uploads/docs/ih38c2d6\\_ESCCAP\\_Guidelines\\_GL5\\_01Oct2012.pdf](http://www.esccap.org/uploads/docs/ih38c2d6_ESCCAP_Guidelines_GL5_01Oct2012.pdf).
- Ferasin, L., & Knight, D. (2005). Filarial infections. In S. Shaw, & M. Day (Eds.). *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (pp. 51-61). London, UK: Manson Publishing Ltd.
- Ferreira, M., Fattori, K., Souza, F. & Lima, V. (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp.. *Veterinary Parasitology*, 165, 150-154.
- Ferreira E., Lana M., Carneiro M., Reis, A., Paes, D., Silva, E., Challig, H. & Gontijo, C. (2007a). Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral

leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, 146, 235-241.

Ferreira, R., Cerqueira, A., Pereira, A., Guimarães, C., Sá, A., Abreu, F., Massard, C. & Almosny, N. (2007b). *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 5 (3), 113-119.

Ferreira, I. (2010). *Rastreo sorológico de alguns agentes de zoonoses em cães silvestres no norte de Portugal*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica. Lisboa: Faculdade de Medicina de Lisboa – Universidade de Lisboa.

Ferroglio, E. & Vitale, F. (2006). Diagnosis of Leishmaniosis: between old doubts and new uncertainties. *Veterinary Research Communications*, 30, 35-38.

Figueiredo, T. (2007) *Estudo da prevalência de doenças associadas a vectores em cães domésticos do distrito de Bragança*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica. Lisboa: Faculdade de Medicina de Lisboa – Universidade de Lisboa.

Figueiredo, F., Madeira, M., Nascimento, L., Abrantes, T., Mouta-Confort, E., Passos, S. & Schubach, T. (2010) Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(4),193-196.

Fortin, J. & Slocombe, J. (1981). Temperature requirements for the development of *Dirofilaria immitis* in *Aedes triseriatus* and *Ae. vexans*. *Mosquito News*, 41, 625-633.

Foster, W. & Walker, E. (2009). Mosquitoes (Culicidae). In G. Mullen & L. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*. (pp.201-253). Boston, USA: Academic Press.

Fraga, E., Barreiro, J., Goicoa, A., Espino, L., Fraga, G & Barreiro, A. (2011). Abdominal ultrasonographic findings in dogs naturally infected with babesiosis. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 52, 323-329.

Fritz, D. (2010). A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitology Research*, 106(6), 1339-1342.

FRONTEX, (2011). Poseidon Land 2012, Greek-Turkish border . Acedido em Jan. 29, 2013, disponível em: <http://www.frontex.europa.eu/media-centre/image-gallery/poseidon-land-2012-rjmMyz>

Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I. & Xuan, X. (2005). Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *International Journal of Parasitology*, 35, 1031-1035.

Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., & Solano-Gallego, L. (2005). Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*, 134(1-2), 77-85.



- García, A. (2006). Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Veterinary Parasitology*, 138, 97-102.
- Gavazza, A., Bizzeti, M. & Papini, R. (2003). Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 154 (8-9), 565–571.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M. & Cringoli, G. (2005). Is heartworm really spreading in Europe?. *Veterinary Parasitology*, 133, 137-148.
- Genchi, C., Simón, F. & Kramer, L. (2005b) *Dirofilariosis in Humans: Is it a Real Zoonotic Concern?* [versão eletrónica]. Proceedings of the 30th World Congress of World Small Animal Veterinary Association. Acedido em Jan., 2013, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2005&PID=10908&Print=1&O=Generic>
- Genchi, C., Venco, L. & Genchi, M. (2007). Guidelines for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. In C. Genchi, L. Rinaldi & G. Cringoli (Eds.). *Mappe Parassitologiche 8*. (pp.139-144). Naples, Italy: Giuseppe Cringoli
- Githeko, A., Lindsay, S., Confalonieri, U. & Patz, J. (2000). Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(9), 1136-1147.
- Gomes, Y., Cavalcanti, M., Lira, R., Abath, F. & Alves, L. (2008) Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175, 45-52.
- Gonen, L., Strauss-Ayali, D., Shkap, V., Vincent-Johnson, N., Macintire, D.K., Baneth, G., (2004). An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. *Veterinary Parasitology*, 122, 131–139.
- Gosling, P. (2005). *Dictionary of Parasitology*. Florida: Taylor & Francis Group.
- Götsch, S., Leschnik, M., Duscher, G., Burgstaller, J. P., Wille-Piazzai, W., & Joachim, A. (2009). Ticks and haemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde. *Veterinary Parasitology*, 166 (1-2), 171-174.
- Gopegui R., Peñalba B., Goicoa A., Espada Y., Fidalgo L. & Espino L. (2007). Clinico-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. *The Veterinary Journal*, 174, 129-132
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181, 23-30
- Gray, J., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O. & Lindgren, E. (2008). Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009.
- Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K-P., Weiss, L. (2010). Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 1, 3–10

- Harrus, S., Waner, T. & Neer, T. (2012). Ehrlichia canis Infection. In C. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (4th Ed.) (pp.227-240). St. Louis, USA: Saunders, Elsevier.
- Harvey, J. (2001). Platelets. In J. Harvey (Ed.), *Atlas of Veterinary Hematology*. (pp. 75-79). Philadelphia: Saunders
- Harvey, J. (2012a). *Anaplasma platys* infection (Trombocytotropic anaplasmosis). In C. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (4th Ed.) (pp.256-258). St. Louis, USA: Saunders, Elsevier.
- Harvey, J. (2012). *Veterinary Hematology – A Diagnostic Guide and Color Atlas*. St. Louis, USA: Elsevier Saunders
- Hartelt, K., Rieker, T., Oehme, R., Brockmann, S., Müller, W. & Dorn, N. (2007). First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector borne and zoonotic diseases*, 7, 163-166.
- Hoch, H. & Strickland, K. (2008) Canine and feline dirofilariasis: Life cycle, pathophysiology, and diagnosis. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, 30 (5), 133-141. .
- Holman, P. J. & Snowden, K. F. (2009). Canine Hepatozoonosis and babesiosis, and feline cytauxzoonosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39, 1035-1053.
- Hornok, S., Meli, M. L., Perreten, A., Farkas, R., Willi, B., Beugnet, F., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann (2010). Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Veterinary Microbiology*, 140(1-2), 98-104.
- Huang, H., Unver, A., Perez, M., Orellana, N. & Rikihisa, Y. (2005). Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in Venezuela. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 211-216
- Hubálek, Z. & Rudolf, I. (2011). *Microbial Zoonoses and Sapronoses*. Dordrecht-Heidelberg-London-New York: Springer
- Huebner, J., Vahlenkamp, T. W., Müller, E., Langbein-Detsch, I. (2006) *Mycoplasma* infection in anaemic and non anaemic dogs in Germany. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol 20, Issue 3, 712. .
- Hulme-Moir, K., Barker, E., Stonelake, A., Helps, C., and Tasker, S. (2010). Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor antibiotic therapy in a dog with naturally acquired *Mycoplasma haemocanis* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(4), 582-587.
- Hunfeld, K.-P., Hildebrandt, A. & Gray, J. (2008). Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology* 38, 1219-1237

- Inokuma, H., Fujii, K., Matsumoto, K., Okuda, M., Nakagime, K., Kosugi, R., Hirakawa, M. & Onishi, T. (2002). Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Veterinary Parasitology*, 110, 145-152
- Inokuma, H., Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., Hammad, A., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M. & Brouki, P. (2006). Epidemiological survey of *Ehrlichia canis* and related species infection in dogs in eastern Sudan. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1078, 461-463. (so tenho abstract na net)
- Iori, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Pietrobelli, M., Tampieri, M., Galuppi, R. & Cancrini, G. (2010). Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. *Veterinary Parasitology*, 170, 291-296.
- Irwin, P. (2005). Babesiosis and Cytauxzoonosis. In: Shaw, S and Day, M. (Eds.). *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. London: Manson Publishing.
- Irwin, P. (2007). Blood, bull terriers and babesiosis: a review of canine babesiosis. *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association*. Sydney, Australia.
- Irwin, P. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2(0), 1-9.
- Irwin, P. (2010) Canine Babesiosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40 (6), 1141-1156.
- Ivanov, A. & Tsachev, I. (2008). *Hepatozoon canis* and hepatozoonosis in the dog. *Trakia Journal of Sciences*, 6 (2), 27-35.
- Jacobson, L. (2006). The South African form of severe and complicated canine babesiosis: Clinical advances 1994–2004. *Veterinary Parasitology*, 138. 126-139
- Jacsó, O., Mándoki, M., Majoros, G., Pétsch, M., Mortarino, M., Genchi, C., and Fok, E. (2009). First autochthonous *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) infection in a dog in Hungary. *Helminthologia* 46, 159-161.
- Jefferies, R., Ryan, U., Jardine, J., Broughton, D., Robertson, I. & Irwin, P. (2007). Blood, Bull Terriers and Babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 85: 459–463
- Jefferies, R., Ryan, U., Jardine, J., Robertson, I. & Irwin, P. (2007). *Babesia gibsoni*: Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. *Experimental Parasitology*, 117, 115–123
- Jerrold, M. & Killian, V. (2007). In U.S. Army Medical Department Center & School, *U.S. Army Medical Department Journal*, July-September 2007, Fort Sam Houston, USA

- Johnson E., Ewing S., Barker R., Fox, J., Crow, D. & Kocan, K. (1998). Experimental transmission of *Ehrlichia canis* by *Dermacentor variabilis*. *Veterinary Parasitology*, 74, 277-288.
- Karagenc, T., Pasa, S., Kirli, G., Hosgor, M., Bilgic, H. B., Ozon, Y., Atasoy, A. & Eren, H. (2006). A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Veterinary Parasitology*, 135(2), 113-119.
- Kartashev, V., Batashova, I., Kartashov, S., Ermakov, A., Mironova, A., Kuleshova, Y., Ilyasov, B., Kolodiy, I., Klyuchnikov, A., Ryabikina, E., Babicheva, M., Levchenko, Y., Pavlova, R., Pantchev, N., Morchón, R., and Simón, F. (2011). Canine and human dirofilariosis in the Rostov region (southern Russia). *Veterinary Medicine International* 685713
- Kelch, W. (1981). *Military working dogs and canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia) in the Vietnam War*. Thesis for Master of Military Art and Science. Faculty of the U.S. Army Command and General Staff College.
- Kemming, G., Messick, J., Enders, G., Boros, M., Lorenz, B., Muenzing, S., Kisch-Wedel, H., Mueller, W., Hahmann-Mueller, A., Messmer, K. & Theim, E. (2004a). *Mycoplasma haemocanis* infection – a kennel disease?. *Comparative Medicine*, 54(4), 404-409.
- Kemming, G., Messick, J., Mueller, W., Enders, G., Meisner, F., Muenzing, S., Kisch-Wedel, H., Schiropf, A., Wojtczyk, C., Packert, K., Messmer, K. & Theim, E. (2004b). Can we continue research in splenectomized dogs? *Mycoplasma haemocanis*: old problem – new insight. *European Surgical Research*, 36, 198-205.
- Kenny, M., Shaw, S., Beugnet, F., & Tasker, S. (2004). Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in french dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5397-5399.
- Kettner, F., Reyers, F. & Miller, D. (2003). Thrombocytopaenia in canine babesiosis and its clinical usefulness. *Journal of the south african veterinary association*, 74, 63–68.
- Kirtz, G., Leschnik, M., Hooijberg, E., Tichy, A. & Leidinger, E. (2010). In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe. *Tierärztl Prax*, 40 (K), 87–94
- Kjemtrup, A., Kocan, A., Whitworth, L., Meinkoth, J., Birkenheuer, A., Cummings, J., Boudreaux, M., Stockham, S., Irizarry-Rovira, A. & Conrad, P. (2000). There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *International Journal for Parasitology*, 30, 1501-1505.
- Kjemtrup, A., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B., and Carreno, R. (2006). *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Veterinary Parasitology* 138, 103-111.
- Kjemtrup A. & Conrad P. (2006). A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. *Veterinary Parasitology*, 138, 112-117.

- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P. & Pfister, K. (2008). Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 1289-1295.
- Lappin, M. (2012). Microbiology and Infectious Disease. In M. Willard & H. Tvedten (Eds.), *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. (5th Ed.). (pp.315-336). St. Louis, USA: Elsevier Saunders
- Law, J. (1903). *Textbook of Veterinary Medicine: vol. V. Parasites, parasitisms, etc.* New York, USA: Ithaca, James Law
- Lawrence, E. (Ed.). *Henderson's Dictionary of Biology*. (13th Ed.). England: Pearson Education Limited
- Leschnik, M., Kirtz, G., Tichy, A., and Leidinger, E. (2008). Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *International Journal Of Medical Microbiology*, 298, 243-248. .
- Losson, B.; Mignon, B. Avez, F., Malaise, F., Mignon, B., (1999) Description de trois cas autochtones de babesiose canine (*Babesia canis*) en Belgique. *Annales de Medecine Veterinaire*, 143, 119-124.
- Li, Y., Wang C., Allen K., Little S., Ahluwalia S., Gao D., Macintire D., Blagburn B., Kaltenboeck B. (2008). Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. *Veterinary Parasitology*, 157, 50-58. .
- Litster A, Atkins C, Atwell R, Buchanan J. (2005). Radiographic cardiac size in cats and dogs with heartworm disease compared with reference values using the vertebral heart scale method: 53 cases. *Journal of Veterinary Cardiology*, 7, 33-40.
- Little, S. (2010). Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(6), 1121-1140.
- Losonsky J., Thrall D. & Lewis R. (1983). Thoracic radiographic abnormalities in 200 dogs with heartworm infestation [abstract]. *Veterinary Radiology*, 24, 120-123.
- Macintire, K., Boudreaux, K., West, D., Bourne, C., Wright, C. & Conrad, A. (2002) *Babesia gibsoni* infection among dogs in the south-eastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220, 325-329
- Madeira de Carvalho, L.M. (2008) – Globalização, Mudanças Sócio-Culturais e Alterações Climáticas: Influência nos Parasitas dos Animais Domésticos e seu Controle. *Anuário Saúde em Revista. Saúde e Bem-Estar*. Edição 2008. Distribuído com o Jornal Público, 25 de Maio de 2008, pp. 209-210.
- Maia, C. & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274-287.

- Maia C, Nunes, M. & Campino, L. (2008). Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), 555–560.
- Martin, A., Brown, G., Dunstan, R. & Roberts, T. (2005). *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Experimental Parasitology*, 109(3), 176-180.
- Matijatko, V., Kis, I., Torti, M., Brkljacić, M., Kucer, N., Rafaj, R., Grden, D., Zivicnjak, T. & Mrljak, V. (2009). Septic shock in canine babesiosis. *Veterinary Parasitology*. 162, 263-270.
- McCall, J., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J. & Venco, L. (2008). Heartworm Disease in Animals and Humans. In: D. Rollinson & S. Hay (Eds.), *Advances in Parasitology* (66) (pp.195-230). London: Elsevier.
- Mehlhorn, H. (Ed.). (2008). *Encyclopedia of Parasitology*. (3rd Ed.). Berlin: Springer.
- Meireles, J. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e profilaxia da leishmaniose canina. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., pp. 93-99
- Mekuzas, Y., Gradoni, L., Oliva, G., Foglia Manzillo, V. & Baneth, G. (2009). *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 30–31
- Menn B, Lorentz S, Naucke T. (2010). Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasites & Vectors*, 3, 34.
- Mencke, N. (2011). The importance of canine leishmaniosis in non-endemic areas, with special emphasis on the situation in Germany. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 124 (11), 434-442.
- Messick, J. B. (2004). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1), 2-13.
- Messick, J. B., & Harvey, J. W. (2012). Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In C. Greene (Ed.), *Infectious Diseases Of The Dog and Cat*.(4th Ed.)(pp.310-319). St. Louis, USA: Saunders, Elsevier.
- Messick, J. B., Walker, P. G., Raphael, W., Berent, L., and Shi, X. (2002). '*Candidatus mycoplasma haemodidelphidis*' sp. nov., '*Candidatus mycoplasma haemolamae*' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotropic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 693-698.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. & Deplazes, P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays an immunofluorescent-antibody test and two rapid tests (immunochromatographic dipstick and gel tests) for serological diagnosis of

symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5515-5519.

Miller L. & Crosbie P. (2011). Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) in Fresno and Madera counties, California: prevalence differences between foothill and valley *habitats*. *Veterinary Parasitology*, 175 (1-2), 84-91

Miranda. S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L. & Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Veterinary Parasitology*, 85, 35-38

Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., *et al.* (2007). A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Research in Parasitology*, 101, 253-257.

Miró, G, Cardoso, L., Pennisi, M., Oliva, G. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24 (7), 371-377

Miterpáková, M., Antolová, D., Hurníková, Z., Dubinský, P., Pavlacka, A. & Németh, J. (2010). *Dirofilaria* infections in working dogs in Slovakia [abstract]. *Journal of Helminthology*, 84, 173–176. Acedido em Dez. 10, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19728899>

Montoya, J., Morales, M., Ferrer, O., Molina, J. & Corbera, J. (1998). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994–1996). *Veterinary Parasitology*, 75, 221–226

Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J. & Mellado-Hernández, I. (2012). Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – new distribution trends. *Frontiers in Physiology*, 3, 1-11.

Moshfe, A., Mohebalí, M., Edrissian, G., Zarei, Z., Akhoundi, B., Kazemi, B., Jamshidi, S. & Mahmoodi, M. (2009). Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. *Acta Tropica*, 112, 101-105

Mundim, A., Morais, I., Tavares, M., Cury, M. & Mundim, M. (2008). Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 153(1-2), 3-8.

Museux, K., Boretti, F., Willi, B., Riond, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L., Wittenbrink, M., Tasker, S., Wengi, N., Reusch, C., Lutz H and Hofmann-Lehmann R. (2009). In vivo transmission studies of “*Candidatus* Mycoplasma turicensis” in the domestic cat. *Veterinary Research*, 40, 45.

Murase, T., Iwai, M., and Maede, Y. (1993). Direct evidence for preferential multiplication of *Babesia gibsoni* in young erythrocytes. *Parasitology research* 79, 269-271.

- Mylonakis, M. E., Koutinas, A.F., Billinis, C., Leontides, L. S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T., Fytianou, A. (2003) Evaluation of citology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*) a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, 91, 197-204
- Mylonakis, M., Papadopoulos, E., Koutinas, A., Paitaki, C. & Leontides, L. (2004). Comparative methodology for the detection and differentiation of circulating microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. *Journal of Helminthology*, 78, 137-140
- Naucke, T. & Lorentz, S. (2011). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, 5 (67)
- Neimark, H., Johansson, K.-E., Rikihisa, Y. & Tully, J. (2001). Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 891-899.
- Nelson, C. (2012). Heartworm Disease. In: Greene, C. E. (Ed.), *Infectious Diseases Of The Dog and Cat*. (4th Ed.) (pp.865-877). St. Louis, USA: Saunders, Elsevier.
- Nicolaiewsky, T., Richter, M., Lunge, V., Cunha, C., Delagostin, O., Ikuta, N., Fonseca, A., Silva, S. & Ozaki, L. (2001). Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 101, 9–21
- Nonaka N., Thacker, B., Veen, T. & Bull, R. (1994). In vitro maintenance of *Eperythrozoon suis*. *Veterinary Parasitology* (1996)
- Novacco, M., Meli, M., Gentilini, F., Marsilio, F., Ceci, C., Pennisi, M. (2010). Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary Microbiology*, 142(3-4), 276-284.
- Øines, Ø., Storli, K., & Brun-Hansen, H. (2010). First case of babesiosis caused by *Babesia canis canis* in a dog from Norway. *Veterinary Parasitology*, 171(3-4), 350-353.
- Oliva, G., Scalone, A., Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T. & Gradoni, L.. (2006). Incidence and time course of leishmania infantum infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1318-1322.
- Orndorff G., Cooper B., Smith W. & Ryan J. (2000). Canine visceral leishmaniasis in Sicily [abstract]. *Military Medicine*, 165(1), 29-32. Acedido em Nov. 28, 2012, disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/10658425>
- Otranto, D., Paradies, P., Lia, R. P., Latrofa, M. S., Testini, G., Cantacessi, C., Mancke, N., Galli, G., Capelli, G. & Stanneck, D. (2007). Efficacy of a combination of 10%



imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, 144, 270-278.

Otranto D., Dantas-Torres F. & Breitschwerdt E. B. (2009a). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology*, 25, 157-163.

Otranto D., Dantas-Torres F. & Breitschwerdt E. B. (2009b). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends in Parasitology*, 25, 228-235.

Otranto, D., Paradies, P., de Caprariis, D., Stanneck, D., Testini, G., Grimm, F., Deplazes, P. & Capelli G. (2009c). Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16, 337-343.

Otranto, D. & Dantas-Torres, F. (2010) Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*, 3, 2.

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M., Stanneck, D., Decaprariis, D., Capelli, G & Baneth, G. (2011). Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites & Vectors*, 4(1), 55.

Paludo, G., Dell'porto, A., Pimentel, D., Martins, V., Cunha, E., Melo, R. & Peixe, G. (2002). Determinação dos valores hematológicos e ocorrência de hemoparasitas em cães do Batalhão de Operações Especiais da Polícia Militar do Distrito Federal [abstract]. In Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, p. 108. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002.

Pentecost, R., Marsh, A., Niehaus AJ, Daleccio J, Daniels JB, Rajala-Schultz PJ & Lakritz J. (2012). Vertical transmission of *Mycoplasma haemolamae* in Alpacas (*Vicugna pacos*). *iSmall ruminant research*, 106, 181-188

Pereira da Fonseca, I., Madeira de Carvalho, L., Carvalho, S. & Carvalho-Varela, M. (1991). Prevalência da dirofilariose na população canina portuguesa. Detecção de microfilárias sanguíneas. *Veterinária Técnica*. 1991. pp. 36–38.

Pereira da Fonseca, I., Cortes, S., Magalhães, A., Madeira de Carvalho, L. M., Meireles, J., Santos-Gomes, G., Campino, L., Fazendeiro, M. (2003). Prevalência de *Leishmania* spp. em Raposas Vermelhas (*Vulpes vulpes silacea*, Miller, 1907) em Portugal. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Pereira da Fonseca, I. & Santos-Gomes, G. (2008). Capítulo VIII: Prespectivas futuras. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., pp. 105-110.

Pereira da Fonseca, I. & Villa de Brito, M. (2008). Capítulo VI: Diagnóstico. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., pp. 82-91.

Peters, I. R., Helps, C. R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M.J., Hoelzle, L., Willi, B., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R. & Tasker, S. (2008).

RNase P RNA Gene (rnpB) phylogeny of Hemoplasmas and Other *Mycoplasma* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1873-1877.

- Petney, T., Robbins, R., Guglielmone, A., Apanaskevich, D., Estrada-Pena, A. & Horak, I. (2011). A Look at the World of Ticks. In H. Mehlhorn (Ed.), *Progress in Parasitology Research Monographs Vol. 2*. (pp.283-296). Heidelberg, Germany: Springer
- Pluta, S., Hartelt, K., Oheme, R., Kimming, P. & Mackenstedt, U. (2011). What Else Besides TBE and Borreliosis? Tick-Transmitted Pathogens in Germany and Beyond. In: Mehlhorn, H. (Ed.), *Progress in Parasitology Research Monographs Vol. 2*. (pp.297-322). Heidelberg, Germany: Springer
- Popov, V., Han, V., Chen, S-M., Dumler, J., Feng, H-M., Andreadis, T., Tehs, R., Walker, D. (1998). Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *Journal of Medical Microbiology*, 47, 235-251
- Prichard, R. (2005). Is anthelmintic resistance a concern for heartworm control? What can we learn from the human filariasis control programs?. *Veterinary Parasitology*. 133: 243-253.
- Ramos, C., Ramos, R., Araújo, F., Guedes Jr., D., Souza, I., Ono, T., Vieira, A., Pimentel, D., Rosas, E., Faustino, M. & Alves, L. (2009). Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*, 18 (1), 58-62.
- Ramos, C. (2012). *A importância da infecção por Leishmania spp. e Dirofilaria immitis em gatos na região de Olhão*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa
- Randolph, S. (2004). Evidence that climate change has caused ‘emergence’ of tick-borne diseases in Europe?. *International Journal of Medical Microbiology*, 293 (37), 5-15
- Rich, S. & Ayala. (2003). Progress in Malaria Research: the Case for Phylogenetics. In D. Littlewood, J. Baker, R. Muller & D. Rollinson (Eds.), *Advances in Parasitology: The Evolution of Parasitism (Vol. 54)*. The Netherlands: Elsevier
- Rikihisa, Y. (1991), The Tribe Ehrlichieae and Ehrlichial Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (3), 286-308
- Rishniw, M., Barr, S., Simpson, K., Frongillo, M., Franz, M. & Alpizar, J. (2006). Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 303-314.
- Rocha, C. (2010). *Dirofilaria immitis e Dirofilariose canina: um estudo retrospectivo*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Rogers, M., Simmons, J., Walker, R., Weisburg, W., Woese, C., Tanner, S., Robinson, I., and Maniloff, J. (1985). Construction of the *Mycoplasma* evolutionary tree from 5S

rRNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume 82 (4), 1160-1164.

Roqueplo, C. (2003). *Influence du port d'un collier antiparasitaire contenant de la deltamethrine sur les performances olfactives du chien*. These pour le Doctorat Veterinaire: La Faculte de Medecine de Créteil.

Rosa, N. (2009). *Rastreio de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da Área Metropolitana de Lisboa*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Roura, X., Peters, I., Altet, L., Tabar, M., Barker, E., Planellas, M., Helps, C., Francino, O., Shaw, S. & Tasker, S. (2010). Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(2), 270-274.

Rubini, A., Paduan, K., Lopes, V. & O'dwyer, L. (2008). Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. *Parasitology research*, 102, 895-899.

Rymaszewska, A. & Grenda, S. (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinari Medicina*, 53, 573-584.

Sano, Y., Aoki M., Takahashi, H., Miura, M. Komatsu, M., Abe, Y., Kakino, J., & Itagaki, T. (2005) The First Record of *Dirofilaria immitis* Infection in a Humboldt Penguin, *Spheniscus humboldti*. *Journal of Parasitology*, 91 (5), 1235-1237.

Sainz, A., Tesouro, M. A., Rodriguez, F., Mayoral, I & Mazzucchelli, F. (1995). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infections in police dogs in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 23, 179-182.

Santos, N.G., Madeira De Carvalho, L.M., Pacheco, C. & Fazendeiro, M.I. (2004) – Mixed hemoprotozoa infection causing disease in an injured, wild iberian wolf *Canis lupus signatus*. The Sixth Conference of the European Wildlife Disease Association, TSE and CWD Workshop, 8-12 September 2004, Poster 30. (Poster).

Santos, A., Santos-Silva, M., Almeida, V., Bacellar, F. & Dumler, J. (2004) Detection of *Anaplasma phagocytophilum* ADN in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 1643-1648.

Santos, A., Bacellar, F. & Dumler, J. (2008). A 4-year study of *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(2), 46-47.

Santos, A., Amaro, F., Santos-Silva, M., Sousa, R., Mathias, M., Ramalhinho, M., Nuncio, M., Alves, M., Bacellar, F. & Dumler, J. (2008). Detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* in Algerian mice (*Mus spretus*), Portugal. *Vector borne and zoonotic diseases*, 9(6), 663-669

- Santos A., Alexandre N., Sousa R., Nuncio M., Bacellar F. & Dumler J. (2009). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Veterinary Record*, 164, 168-171.
- Santos-Silva M., Beati L., Santos A., Sousa R., Nuncio M., Melo P., Santos-Reis M., Fonseca C., Formosinho P., Vilela C. & Bacellar F. (2011) The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*, 55, 85-121.
- Sarma, K., Mondal, D., Saravanan, M., Kumar, M. & Mahendran, K. (2012). Haemato-biochemical changes in *Hepatozoon canis* infected dog before and after therapeutic management. *Journal of Veterinary Parasitology*, 26, 35-38.
- Schetters, T., Moubri and Cooke, B. (2009). Comparison of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with soluble parasite antigens : a review. *Journal of the South African Veterinary Association*, 80, 75-78.
- Schetters, T. (2011). Alternatives to Drug Development in the Apicomplexa. In K. Becker (Ed.). *Molecular Approaches toward Targeted Drug Development*. Weinheim, Germany: Wile.
- Schetters, T. (2012). Canine babesiosis vaccine antigen. Acedido em Out. 15, 2012, disponível em: [http://patentscope.wipo.int/search/docservicepdf\\_pct/id000000017934138](http://patentscope.wipo.int/search/docservicepdf_pct/id000000017934138).
- Schrey C. & Trautvetter E. (1998): Canine and feline heartworm disease-diagnosis and therapy. *Waltham Focus*, 8, 23-30.
- Schoeman, J. (2009). Canine Babesiosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 76, 59-66.
- Seixas, R., Alho A., Guerra, D. & Madeira de Carvalho, L. (2012). Doenças caninas de transmissão vectorial: uma picada com muitas consequências!. *Veterinary Medicine*, 77, 23-46.
- Semenza, J. & Menne, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(6), 365-375.
- Shearer, P. (2011). Literature Review - Heartworm Disease. Banfield Applied Research & Knowledge Team, Banfield Pet Hospital. Acedido em Dez. 5, 2012, disponível em: <http://www.banfield.com/Banfield/files/59/5906a327-4e82-49f7-9432-e7da7fc568a9.pdf>
- Sideris, V., Papadopoulou, E., Dotsika, E. & Karagouni, E. (1999). Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *European Journal of Epidemiology*, 15, 271-276.

- Silva, O. & Braga, G. (2008). Leishmaniose visceral canina no município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 15 (2), 101-102.
- Silva F., Oliveira R., Silva T., Xavier, M., Nascimento, E. & Santos, R. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160:55-59.
- Slonger, J. & Post, K., (2005). *Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. St. Louis, USA: Elsevier Saunders.
- Sikorski, L., Birkenheuer, A., Holowaychuk, M., McCleary-Wheeler, A., Davis, J. & Littman, M. (2010). Babesiosis caused by a large *Babesia* species in 7 immunocompromised dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 24, 127-131.
- Simoes, P., Cardoso, L., Araujo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs - first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites & Vectors*, 4(1), 50.
- Simón, F., López-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Morchón, R. & Martín-Pacho, J. (2005). What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? *Veterinary Parasitology*, 133, 181-189.
- Simpson, R. & Gaunt, S. (1991). Immunocytochemical detection of *Ehrlichia platys* antigens in canine blood platelets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3, 228-231.
- Škardová, I., Škarda, J., Sesztáková, E., Štefančíková, A. & Peko, B. (2002). The diagnosis and differentiation of selected tick-borne diseases: lyme borreliosis and babesiosis [abstract]. *Folia Veterinaria*, 46(2), 94-98. Acedido em Nov. 28, disponível em: <http://oldwww.uvm.sk/dept/journals/folia/volume.php?y=2002&vol=2&page=10-94>
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J. & Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using pcr on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 560-563.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Razia, L., Furlanello, T. & Caldin, M. (2006). Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 515–518.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 1-18.
- Solano-Gallego, L. & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats - Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, 181, 48-60.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 4(1), 1-16.

- Solano-Gallego, L., Rossi, L., Scroccaro, A., Montarsi, F., Caldin, M., Furlanello, T. & Trotta, M. (2012). Detection of *Leishmania infantum* ADN mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 5, 98.
- Song, K., Lee, S., Hayasaki, M., Shiramizu, K., Kim, D. & Cho, K. (2003). Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. *Veterinary Parasitology*, 114, 231-236.
- Suarez M., Espino L., Goicoa A., Fidalgo L. & Santamarina G. (2001). Fatal *Babesia gibsoni* infection in a dog from Spain. *Veterinary Record*, 148, 819-820.
- Suzuki, K., Wakabayashi, H., Takahashi, M., Fukushima, K., Yabuki, A. & Endo, Y. (2007). A possible treatment strategy and clinical factors to estimate the treatment response in *Babesia gibsoni* infection. *Journal of veterinary medical science*, 69 (5), 563-568.
- Strik, N., Alleman, A., Barbet, A., Sorenson, H., Wamsley, H., Gaschen, F., Luckschander, N., Wong, S., Chu, F., Foley, J., Bjoersdorff, A., Stuen, S., Knowles, D. (2007). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clinical and vaccine immunology*, 14(3), 262-268.
- Stuen, S. (2007). *Anaplasma Phagocytophilum* - the Most Widespread Tick-Borne Infection in Animals in Europe. *Veterinary Research Communications*, 31(1), 79-84.
- Sykes, J., Ball, L., Bailiff, N., and Fry, M. (2005). 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 27-30.
- Tabar, M.-D., Roura, X., Francino, O., Altet, L. & Ruiz de Gopegui, R. (2008). Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 325–328.
- Tabar, M.-D., Francino, O., Altet, L., Sánchez, A., Ferrer, L. & Roura, X. (2009). PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. *Veterinary Record*, 164, 112-116.
- Taboada, J. & Lobetti, R. (2006). Babesiosis. In: C. Greene (Ed.). *Infectious Diseases of the dog and cat* (3rd Ed.) (pp. 722-736). Philadelphia, USA: Saunders, Elsevier.
- Tasker S., Helps C., Day M., Harbour D., Shaw S., Harrus S, Baneth G., Lobetti R., Malik R., Beaufils J., Belford C. & Gruffydd-Jones T. (2003). Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: an International Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (8) 3877-3880.
- Terkawi, M. & Igarashi, I. (2011). Drug Discovery against Babesia and Toxoplasma, in Apicomplexan Parasites. In Becker, K. (Ed.). *Molecular Approaches toward Targeted Drug Development*. Weinheim, Germany : Wiley-VCH.

- Toma, B., Barbara, D., Sanaa, M., Benet, J., Shaw, A., Moutou, F., Louzã, A. & Tavares, S. (2004). *Epidemiologia aplicada à luta colectiva contra as principais doenças animais transmissíveis*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Tomás, A. & Romão, S. (2008). Capítulo I: Biologia do Parasita. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., pp. 7-26.
- Traversa, D., Di Cesare, A. & Conboy, G. (2010). Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe, emerging and underestimated. *Parasites & Vectors*, 3, 62.
- Trotta, M., Carli, E., Novari, G., Furlanello, T. & Solano-Gallego, L. (2009). Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. *Veterinary Parasitology*, 165, 318-322
- Tsachev, I., Papadogiannakis, E., Harizanov, R. & Zarkov, I. (2008). Canine visceral leishmaniosis: current situation. *Trakia Journal of Sciences*, 6, 106-105
- Tvedten, H. (2010). Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In D. Weiss & K. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (6th Ed.). (pp.152-161). Iowa, USA: Blackwell Publishing
- Uilenberg, G. (2006). Babesia – A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138, 3-10.
- Unver, A., Perez, M., Orellanda, N., Huang, H. & Rikihisa, Y. (2001). Molecular and Antigenic Comparison of Ehrlichia canis Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2788-2793
- Valden, S., Knoll, J., Smith, F. & Tilley, L. (2009). *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Laboratory Tests and Diagnostic Procedures: Canine and Feline*. Ames, USA: Wiley-Blackwell.
- Vargas-Hernández, G., André, M., Faria, J., Munhoz, T., Hernández-Rodriguez, M., Machado, R., Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 186, 254-260.
- Venable, J. H., and Ewing, S. A. (1968). Fine-structure of *Haemobartonella canis* (rickettsiales: bartonellacea) and its relation to the host erythrocyte. *The Journal of Parasitology*, 54, 259-268.
- Vezzani, D., Fontanarrosa, M. & Eiras, D. (2008). Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs at the southern distribution limit of the parasite in South America? Preliminary results. *Veterinary Science*, 85, 113-115.
- Vincent-Johnson, N., Macintire, D. & Baneth, G. (1997). Canine hepatozoonosis: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 19, 51–65.

- Walker, D. (2007). Peripheral blood smear. In R. Cowell, R. Tyler, J. Meinkoth, D. DeNicola (Eds.), *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (3rd Ed.). (pp.254-283). St. Louis: Mosby.
- Waner, T., Strenger, C. & Keysary, A. (2000). Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 240-244.
- Ware, W. (2009) Heartworm disease. In R. Nelson & G. Couto (Eds.), *Small Animal Internal Medicine*. (4th Ed.). (pp.169-183). St Louis, USA: Elsevier.
- Warman, S., Helps, C., Barker, E., Day, S., Sturgess, K., Day, M. & Tasker S. (2010). Haemoplasma infection is not a common cause of canine immune-mediated haemolytic anaemia in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 51(10), 534-539.
- Watier-Grillot, S., Marié, J., Cabre, O. & Davoust, B. (2011). Survey of Canine *Dirofilaria immitis* Infection in New Caledonia. *Veterinary Medicine International*, 5.
- Weiss, D. & Tvedten, H. (2012). Erythrocyte Disorders. In M. Willard & H. Tvedten (Eds.), *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. (5th Ed.). (pp.12-37). St. Louis, USA: Elsevier Saunders.
- Wengi, N., Willi, B., Boretti, F., Cattori, V., Riond, B., Meli, M., Reusch, C. E., Lutz, H & Hofmann-Lehmann, R. (2008). Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Veterinary Microbiology*, 126 32–141.
- Wielinga, P., Gaasenbeek, C., Fonville, M., de Boer, A., de Vries, A., Dimmers, W., Jagers, G., Schouls, L., Borgsteede, F. & Giessen, J.. (2006). Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7594-7601.
- Willi, B., Boretti, F., Tasker, S., Meli, M., Wengi, N., Reusch, C., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2007a). From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. *Veterinary Microbiology*, 125(3-4), 197-209.
- Willi, B., Boretti, F., Meli, M., Bernasconi, M., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Reusch, C., Lutz, H. & Hofman-Lehmann, R. (2007b). Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3798-3802.
- Willi, B., Novacco, M., Meli, M., Wolf-Jäckel, G., Boretti, F., Wengi, N., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2010). Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 152, 237-244.



- Woods, J., Wisnewski, N. & Lappin, M. (2006). Attempted transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by feeding cats infected *Ctenocephalides felis*. *American Journal of Veterinary Research*, 67(3), 494-497.
- Yabsley, M. J., McKibben, J., Macpherson, C. N., Cattan, P. F., Cherry, N. A., Hegarty, B. C., *et al.* (2008). Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), 279-285.
- Yabsley, M. & Shock, B. (2013). Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2, 18–31.
- Yeagley, T., Reichard, M., Hempstead, J., Allen, K., Parsons, L., White, M., Little, S. & Meinkoth, J. (2009). Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small *Babesia* “Spanish isolate” in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235, 535-539.
- Yisaschar-Mekuzas, Y., Jaffe, C., Pastor, J., Cardoso, L. & Baneth, G. (2013). Identification of *Babesia* species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, & evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. *Veterinary Parasitology*, 191, 367-373.
- Zahler M., Rinder, H., Schein, E. & Gothe, R. (2000). Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology*, 89, 241-248.
- Zajac, A. & Conboy, G. (2012). *Veterinary Clinical Parasitology* (8th Ed.). West Sussex, U.K.: John Wiley & Sons.